



FUNCIONES PROTECTORAS DE LOS ASTROCITOS EN LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO CEREBRAL

VALENCIA OCTUBRE DE 2018

Tesis Doctoral

**FUNCIONES PROTECTORAS DE LOS
ASTROCITOS EN LA INFLAMACIÓN Y
EL ESTRÉS OXIDATIVO CEREBRAL**

ADRIÁN JORDÁ VALLÉS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Directores:

Dra. Soraya Vallés Martí

Dr. Martín Aldasoro Celaya

Dra. M^a Dolores Mauricio Aviñó



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Dra. Soraya Vallés Martí, Dr. Martin Aldasoro Celaya y Dra. M^a Dolores Mauricio Aviñó, Profesores del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **D. Adrián Jordá Vallés**, con DNI: **44893410 D**, ha realizado bajo nuestra dirección la presente **TESIS DOCTORAL**, titulada:

“FUNCIONES PROTECTORAS DE LOS ASTROCITOS EN LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO CEREBRAL”

Para la obtención del título de Doctor y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación.

Valencia, 10 de septiembre de 2018

Dra. Soraya Vallés Martí Dr. Martin Aldasoro Celaya Dra. M^a Dolores Mauricio Aviñó

D.N.I. 43008486G

D.N.I. 15827704R

D.N.I. 53204038R

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por tanta ayuda y paciencia conmigo.

A mi hermana.

A mi novia por todo su apoyo.

A mis compañeros de trabajo.

A Juan Campos por estar siempre dispuesto a solventar problemas.

A mis amigos que hacen todo más llevadero.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 INTRODUCCIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.2 DEMENCIA Y ALZHEIMER	4
1.3 EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	11
1.3.1 FUNCIONES CONGNITIVAS	14
1.3.1.1 LA MEMORIA	14
1.3.1.2 EL LENGUAJE.....	16
1.3.1.3 LAS FUNCIONES EJECUTIVAS.....	17
1.3.1.4 LA PRAXIA.....	18
1.3.1.5 LA GNOSIA	20
1.3.2 CRONOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	21
1.4 TIPOS DE CÉLULAS EN EL CEREBRO	23
1.4.1 NEURONAS	23
1.4.1.1 SINAPSIS NEURONAL.....	26
1.4.1.2 PLASTICIDAD NEURONAL	35
1.4.2 CÉLULAS GLIALES	39
1.4.2.1 ASTROCITOS.....	41
1.4.2.2 OLIGODENDROCITOS.....	49
1.4.2.3 MICROGLÍA	51
1.5 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)	54
1.5.1 EL PÉPTIDO Aβ Y SU SÍNTESIS	58
1.5.2 ACTIVIDAD NO PATOLÓGICA DEL β AMILOIDE	63
1.5.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA β AMILOIDE.....	63
1.5.4 ESTRATEGIAS CONTRA EL AMILOIDE.....	64

1.5.5 RITMOS CIRCADIANOS Y ALZHEIMER.....	66
1.5.6 MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA β AMILOIDE	68
1.5.7 TEORIAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	69
1.5.7.1 TEORÍA DEL PÉPTIDO β AMILOIDE	70
1.5.7.2 TEORÍA DE LA PROTEÍNA TAU.....	71
1.5.7.3 MUTACIONES GENES CROMOSOMAS 17 Y 21.....	72
1.5.7.4 TEORÍA VASCULAR	73
1.6 MUERTE CELULAR: NECROSIS Y APOPTOSIS	75
1.6.1 NECROSIS.....	75
1.6.2 APOPTOSIS	76
1.6.2.1 ETAPAS DE LA APOPTOSIS	78
1.6.2.1.1 LA FASE DE INICIACIÓN.....	79
1.6.2.1.2 LA FASE DE EJECUCIÓN	79
1.6.2.1.3 LA FASE DE ELIMINACIÓN	87
1.7 MUERTE CELULAR EN EL ALZHEIMER	90
1.8 NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD	93
1.9 TRATAMIENTOS PARA LA EA	105
1.10 RANOLAZINA Y ALZHEIMER.....	109
1.11 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA RANOLAZINA	112
1.12 EL CICLO CELULAR	119
2. HIPÓTESIS.....	127
3. OBJETIVOS.....	131
4. MATERIAL Y MÉTODOS	135
4.1 REACTIVOS	135
4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	138
4.3 ENSAYOS	140

4.3.1 ENSAYO LOWRY	140
4.3.2 ENSAYO MTT	140
4.3.3 ENSAYO ACTIVIDAD CASPASA 3.....	142
4.3.4 DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO	143
4.3.5 ANÁLISIS DE INMUNO-TRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)	144
4.3.6 DETERMINACIÓN NIVELES DE PERÓXIDOS	147
4.3.7 BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN ASTROCITOS.....	147
4.3.8 KITS DE ELISA	148
4.3.9 TIPOS DE TINCIONES	148
4.4 TAMPONES, AGENTES Y FÁRMACOS.....	149
4.5 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	154
4.5.1 MICROSCOPIA CONFOCAL	154
4.5.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	155
4.5.3 ENSAYO AZUL DE TRIPANO.....	157
4.6 CULTIVOS PRIMARIOS.....	157
4.6.1 CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS	157
4.6.2 CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS	158
4.6.3 CULTIVO MIXTO ASTROCITOS Y NEURONAS.....	160
4.7 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA	161
5. RESULTADOS	165
5.1 DIFERENCIAS ASTROCITOS Y NEURONAS	165
5.2 CULTIVO MIXTO NEURONAS Y ASTROCITOS.....	167
5.3 CICLO CELULAR Y MUERTE NEURONAL	168
5.4 PROTECCIÓN ASTROCITOS SOBRE NEURONAS	170
5.5 CASPASA 3 TRAS TRATAMIENTO CON A β ₁₋₄₂	172

5.6 CITOCROMO C EN NEURONAS EN CULTIVO.....	173
5.7 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CÉLULAS CULTIVADAS.....	174
5.8 BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN ASTROCITOS.....	175
5.9 NIVELES DE PERÓXIDOS EN ASTROCITOS	177
5.10 EXPRESIÓN DE MN-SOD EN ASTROCITOS	179
5.11 EXPRESIÓN PROTEICA DE NF-κB e IκB	179
5.12 EXPRESIÓN PROTEICA DE LA PROTEÍNA TFAM	181
5.13 EXPRESIÓN PROTEICA DE LA PROTEÍNA PGC-1	182
5.14 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PPAR-γ	183
5.15 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA SIRT-1.....	184
5.16 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p38 Y p-p38.....	185
5.17 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 y p-p53.....	187
5.18 RN Y ENSAYO EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO	188
5.19 RN Y ENSAYO MTT EN ASTROCITOS	189
5.20 RN Y ENSAYO MTT EN NEURONAS.....	190
5.21 RN Y ENSAYO LDH EN ASTROCITOS.....	191
5.22 CASPASA 3 EN ASTROCITOS CON RN.....	193
5.23 EXPRESIÓN DE SMAC/DIABLO CON RN EN ASTROCITOS.....	194
5.24 EXPRESIÓN DE SMAC/DIABLO CON RN EN NEURONAS	195
5.25 MEDICIÓN DE IL-1β EN ASTROCITOS CON RN	196
5.26 MEDICIÓN DE IL-1β EN NEURONAS CON RN.....	197
5.27 MEDICIÓN DE TNF-α EN ASTROCITOS CON RN	198
5.28 MEDICIÓN DE TNF-α EN NEURONAS CON RN	199
5.29 RN Y EXPRESIÓN DE PPAR-γ EN ASTROCITOS	200
5.30 RN Y EXPRESIÓN DE PPAR-γ EN NEURONAS.....	201

5.31 RN Y CU/ZN-SOD EN ASTROCITOS.....	202
5.32 RN Y CU/ZN-SOD EN NEURONAS	204
5.33 RN Y MN-SOD EN ASTROCITOS	204
5.34 RN Y EXPRESIÓN DE MN-SOD EN NEURONAS.....	206
6. DISCUSIÓN.....	209
7. CONCLUSIONES.....	235
8. BIBLIOGRAFÍA.....	241

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Demencia Senil</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2: Sistema Nervioso Central</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3: Memoria cerebral.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4: Área de Broca y de Wernicke</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5: Cronología de la enfermedad de Alzheimer</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6: Neuronas mediante contraste de fases.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 7: Inmunofluorescencia MAP-2+TRICT (rojo)</i>	<i>26</i>
<i>Figura 8: Relación neuronas y astrocitos.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 9: Receptor-canal de acetilcolina (Ach).....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 10: Receptor nicotínico de la Ach</i>	<i>33</i>
<i>Figura 11: Neurogénesis.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 12: Proceso de Neurogénesis en el hipocampo.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 13: Astrocitos teñidos con GFAP+FIFT (verde).....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 14: Astrocito Fibroso y Protoplásmico</i>	<i>42</i>
<i>Figura 15: Astrocito fibroso, fluorescencia confocal</i>	<i>43</i>
<i>Figura 16: Astrocitos. Inmunofluorescias GFAP + FITC (verde)</i>	<i>45</i>
<i>Figura 17: Astrocitos. GFAP (verde) + Hoech 33342 (azul).....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 18: Oligodendrocito.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 19: Microglía de cerebello teñida NADPasa.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 20: Citoquinas involucradas en la respuesta de inflamación .</i>	<i>53</i>
<i>Figura 21: Alzheimer y cerebro.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22: Estructura de la proteína APP</i>	<i>59</i>
<i>Figura 23: Procesamiento de la proteína APP.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 24: Ciclo circadiano</i>	<i>67</i>
<i>Figura 25: Muerte celular por necrosis.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 26: Muerte por apoptosis.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 27: Muerte celular por necrosis y por apoptosis</i>	<i>78</i>
<i>Figura 28: Vías de inducción de la apoptosis</i>	<i>81</i>
<i>Figura 29: Vías múltiples de estrés celular y apoptosis.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 30: Vías de la apoptosis.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 31: Complejo IV</i>	<i>92</i>
<i>Figura 32: Fisiopatología oxidativa en el cerebro de Alzheimer.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 33: Cerebro, endotelio, sangre y movimiento de Aβ.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 34: Proteína TAU</i>	<i>97</i>

<i>Figura 35: Neurotoxicidad celular</i>	<i>99</i>
<i>Figura 36: Balanza anti-oxidación y pro-oxidación</i>	<i>103</i>
<i>Figura 37: Ranolazina.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 38: Electrofisiología en neuronas control y con Ranolazina.</i>	<i>111</i>
<i>Figura 39: Miocitos ventriculares caninos con fallo cardiaco</i>	<i>114</i>
<i>Figura 40: Neuronas control y con Ranolazina.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 41: Ranolazina e isquemia</i>	<i>117</i>
<i>Figura 42: Ciclo celular</i>	<i>120</i>
<i>Figura 43: Ensayo MTT.....</i>	<i>141</i>
<i>Figura 44: Ensayo Caspasa 3.....</i>	<i>143</i>
<i>Figura 45: Detección de las proteínas mediante Western Blot</i>	<i>145</i>
<i>Figura 46 (a, b): Astrocitos. Mitotracker y Hoechst 33342.....</i>	<i>166</i>
<i>Figura 47 (a, b): Astrocitos de 10 días de desarrollo</i>	<i>166</i>
<i>Figura 48: Neuronas en cultivo primario a 6 días de desarrollo.....</i>	<i>166</i>
<i>Figura 49: Astrocitos. Inmunofluorescencia GFAP + FITC (verde) ...</i>	<i>167</i>
<i>Figura 50: Cultivo mixto de neuronas y astrocitos</i>	<i>168</i>
<i>Figura 51: Neuronas en cultivo primario y ciclo celular</i>	<i>170</i>
<i>Figura 52: Viabilidad celular en neuronas y astrocitos</i>	<i>171</i>
<i>Figura 53: Ensayo de la actividad de la Caspasa 3.....</i>	<i>173</i>
<i>Figura 54: Proteína Citocromo c en neuronas</i>	<i>174</i>
<i>Figura 55: Niveles de MDA</i>	<i>175</i>
<i>Figura 56: Agregación mitocondrial en astrocitos</i>	<i>176</i>
<i>Figura 57: Aumento de niveles de peróxidos por Aβ.....</i>	<i>178</i>
<i>Figura 58: Expresión Mn-SOD por Aβ₁₋₄₂ en astrocitos.....</i>	<i>179</i>
<i>Figura 59: Expresión de p-65 (NF-κB) por Aβ₁₋₄₂.....</i>	<i>180</i>
<i>Figura 60: Expresión de la subunidad de IκB causada por Aβ₁₋₄₂</i>	<i>181</i>
<i>Figura 61: Expresión de TFAM en Astrocitos</i>	<i>182</i>
<i>Figura 62: Expresión de PGC-1 en cultivos primarios de Astrocitos</i>	<i>183</i>
<i>Figura 63: Expresión de PPAR-γ en cultivos primarios de Astrocitos</i>	<i>184</i>
<i>Figura 64: Expresión de SIRT-1 en Astrocitos en cultivo primario ...</i>	<i>185</i>
<i>Figura 65: p38 y p-p38 en Astrocitos en cultivo primario.....</i>	<i>186</i>
<i>Figura 66: p53 y p-p53 en Astrocitos en cultivo primario.....</i>	<i>188</i>
<i>Figura 67: Viabilidad celular con Rn en astrocitos</i>	<i>190</i>
<i>Figura 68: Viabilidad celular con Rn en neuronas</i>	<i>191</i>
<i>Figura 69: Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.....</i>	<i>192</i>
<i>Figura 70: Actividad de la Caspasa 3.....</i>	<i>194</i>
<i>Figura 71: Expresión proteica de Smac/Diablo en astrocitos.....</i>	<i>195</i>

<i>Figura 72: Expresión proteica de Smac/Diablo en neuronas.....</i>	<i>196</i>
<i>Figura 73: Determinación de la citoquina IL-18 en astrocitos.....</i>	<i>197</i>
<i>Figura 74: Determinación de la citoquina IL-18 en neuronas</i>	<i>198</i>
<i>Figura 75: Determinación de la citoquina TNF-α en astrocitos.....</i>	<i>199</i>
<i>Figura 76: Determinación de la citoquina TNF-α en neuronas.....</i>	<i>200</i>
<i>Figura 77: Expresión de la proteica de PPAR-γ en astrocitos</i>	<i>201</i>
<i>Figura 78: Expresión proteica de PPAR-γ en neuronas.....</i>	<i>202</i>
<i>Figura 79: Expresión de la proteína Cu/Zn-SOD en astrocitos.....</i>	<i>203</i>
<i>Figura 80: Expresión proteica de Cu/Zn-SOD en neuronas.....</i>	<i>204</i>
<i>Figura 81: Expresión proteica de Mn-SOD en astrocitos</i>	<i>205</i>
<i>Figura 82: Expresión proteica de Mn-SOD en astrocitos</i>	<i>206</i>
<i>Figura 83: Señalización de astrocitos expuestos a Aβ₁₋₄₂</i>	<i>219</i>
<i>Figura 84: Efectos de Rn en astrocitos en cultivo primario</i>	<i>231</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Cerebro y receptores muscarínicos.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 2: Tipos de células gliales</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 3: Enfermedad de Alzheimer</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 4: Teorías enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 5: Los astrocitos incubados a 7x10⁴ cells/35 mm</i>	<i>189</i>

ÍNDICE DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

AIF	<i>Factor inductor de apoptosis</i>
Ara-C	<i>Citosina-β-D-arabinofuranosido</i>
Aβ₁₋₄₂	<i>Beta-amiloide₁₋₄₂</i>
Casp-3	<i>Caspasa 3</i>
Citc	<i>Citocromo c</i>
DIABLO	<i>proteína directa de unión a IAP</i>
DMEM	<i>Medio Eagle modificado de Dulbecco</i>
EA	<i>Enfermedad de Alzheimer</i>
ECL	<i>Aumentador de quimioluminiscencia</i>
EDTA	<i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>
ELISA	<i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima</i>
FITC	<i>Isotiocianato de fluoresceína</i>
GABA	<i>Ácido γ-aminobutírico, sistema gabérgico inhibitorio.</i>
GNDF	<i>Factor neurotrófico derivado de la glía</i>
GFP	<i>Proteína verde fluorescente</i>
HEPES	<i>Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina-etanosulfónico</i>
IAP's	<i>Inhibidoras de proteínas apoptóticas</i>
IFN- γ	<i>Interferón gamma</i>

IL-1β	<i>Interleucina–1 beta</i>
LDH	<i>Lactato deshidrogenasa</i>
MTT	<i>Reducción metabólica-Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol</i>
NGF	<i>Factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor)</i>
NO	<i>Óxido nítrico</i>
NT	<i>Neurotransmisor</i>
p38	<i>Factor tumoral p38</i>
p53	<i>Factor tumoral p53</i>
PAFG	<i>Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP Glial fibrillary acidic protein)</i>
PBS	<i>Tampón fosfato salino (phosphate buffer saline)</i>
PDL	<i>Poli–D-lisina polímero</i>
SDS	<i>Dodecilsulfato sódico</i>
SFB	<i>suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum FBS)</i>
SMAC	<i>Activador 2º de caspasas derivado de las mitocondrias</i>
TBST	<i>Tampón salino de tris con polisorbato 20</i>
TNF-α	<i>Factor de necrosis tumoral-alfa</i>
WB	<i>Inmunotransferencia</i>

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es una de las patologías más prevalentes dentro del grupo de enfermedades neurodegenerativas. Se estima que en un futuro no muy lejano superará a otras patologías como el cáncer o las enfermedades Cardiovasculares. Fue diagnosticada por vez primera por el doctor austriaco Wilson (estudiando alrededor de 15 casos clínicos) y el alemán Alois Alzheimer (con un caso estudiado) en 1907, aunque debido a la prevalencia de la ciencia en Alemania, en aquel tiempo, se decidió dejar el nombre Alzheimer a la enfermedad. La enfermedad requiere de cuidados continuados de los servicios sociosanitarios, con una dependencia también realizada por su entorno familiar más cercano. Es una enfermedad discapacitante sin posibilidad de realizar cualquier actividad diaria, presentando alteraciones en las facultades intelectuales y de comportamiento debido a su cronicidad y degeneración del sistema nervioso (Cayre et al., 2002).

En la Comunidad Valenciana unas 50.000 personas sufren actualmente alguna demencia. Entre ellas, tanto en la comunidad como en el mundo, la enfermedad de Alzheimer supone la causa más común de enfermedad neurodegenerativa (Selkoe, 2001). La enfermedad se inicia en el paciente en el que progresivamente se deterioran sus funciones cognitivas, pero de manera cada vez más continuada va afectando a las personas cuidadoras, normalmente familiares y posteriormente a los servicios sanitarios y sociales, con el consiguiente gasto sanitario importante. La finalidad última ya no es la curación, sino la obtención de la mejor calidad de vida hasta la muerte (Knopman et al., 2018).

1.2 DEMENCIA Y ALZHEIMER

Demencia proviene del latín “*dementia*” que significa “falta de razón”. Hasta el siglo XVIII la palabra demencia o demente se usaba para indicar deterioro intelectual con conducta alterada. Por esta razón también se hablaba de idiotez, imbecilidad o estupidez. La mayoría de los especialistas consideraban que era algo consustancial al envejecimiento y no se pensaba que pudiera ocurrir en edades más jóvenes, por lo menos por causas similares. En el siglo XVIII la percepción cambió gracias a diferentes investigadores, como Philippe Pinel, que consideraban la demencia como una enfermedad,

con un apunte muy importante desde la juricatura, que a partir de ese momento consideraban al enfermo de demencia inimputable ante cualquier delito (Código Napoleónico del 21 de Marzo de 1804 o Código Civil actual de Francia). Durante el siglo XIX evolucionó hacia una visión más próxima a la actual. Los estudios con demencias, en esa época, correlacionaban los síntomas clínicos con los resultados cerebrales vistos después de la realización de la autopsia, demostrando que podían ser consideradas enfermedades orgánicas y además se separaba claramente el paciente demente del discapacitado o retrasado mental. En el primer caso, el paciente pierde facultades que poseía y en el segundo caso nunca las poseyó. Además, dentro de las demencias, las seniles se incluyeron en las de causa vascular. La esclerosis de las arterias cerebrales causada por la edad avanzada, ocasionaría la demencia senil. Esta hipótesis se ha mantenido hasta la actualidad adquiriendo gran importancia en los últimos años, por el declive claro de la teoría amiloidea. A mediados y finales del siglo XIX se separaron las demencias de otras enfermedades psiquiátricas.

En 1907, el austriaco Wilson por un lado (con un número de casos cercanos a la decena) y el alemán Alzheimer por otro (con un solo caso diagnosticado), detectaron pacientes con una clara pérdida de memoria y otras funciones cerebrales, con aumento de ira, situaciones de depresión y delirios.

Posteriormente, tras practicar autopsias cerebrales a dichos enfermos, detectaron atrofia de la corteza cerebral, placas seniles y ovillos neurofibrilares que a partir de ese momento definirían la presencia de la enfermedad de Alzheimer tras autopsia (Yamaguchi et al., 1998). Cabe destacar que la enfermedad adquiriría el nombre de enfermedad de Alzheimer debido a la mayor influencia de Alemania en la ciencia en esa época, aunque Wilson no había definido solo un caso, sino que había diagnosticado alrededor de una decena de casos.

Ya en el siglo XX, a finales de los cincuenta y durante los sesenta, tanto Martin Roth (Roth et al., 1996), como Tolimson y colaboradores (Tomlinson et al., 1970) ocasionaron con sus trabajos un cambio en la definición de la demencia senil. Estudiando enfermos diagnosticados de demencia senil, detectaron que más o menos un 70% presentaban placas seniles y ovillos neurofibrilares (como habían descrito Wilson y Alzheimer) sin encontrar diferencias en el grado de arteroesclerosis cerebral entre pacientes y ancianos no dementes. Concluyeron que la demencia Alzheimer no era una rareza como se pensaba sino que era la principal causa de demencia en personas ancianas. A partir de los 60 se determinó que la enfermedad de Alzheimer era la principal causa de demencia tanto presenil como senil.

Los aspectos esenciales de las demencias para definir las como tales son:

- Adquirido
- Curso progresivo
- Funciones cerebrales afectadas de manera global como lenguaje, memoria, juicio, alteraciones en el estado de ánimo, etc.
- Incapacidad

En la actualidad y concretamente en España (Parekh et al., 2015), los especialistas de la salud definen las demencias de manera como lo indican organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Americana de Psiquiatría. Así, la demencia se caracteriza por:

- Partir de un estado mental normal y producirse una pérdida de memoria con dificultad para registrar, almacenar y recuperar información nueva.
- Afectación del lenguaje o de la capacidad de usar instrumentos o la posibilidad de reconocer estímulos a través de los órganos de los sentidos o en las funciones que rigen la correcta ejecución de actos.
- Repercusión en el ámbito familiar, social o laboral.

- Deben estar con conciencia clara sin somnolencia o delirios.
- Deben permanecer los síntomas unos meses, seis o más.
- Debe ser enfermedad progresiva.

Por lo tanto, la pérdida de memoria que puede ocurrir tras una depresión, un retraso mental leve o moderado, la pérdida transitoria de facultades mentales que se producen tras un delirio o un estado de confusión agudo o el bajo rendimiento intelectual de una persona con escasa o nula escolarización, no debe considerarse en ningún caso demencia. La esperanza de vida cada vez mayor en todos los países desarrollados ha propiciado el incremento de las enfermedades en edades avanzadas en estas sociedades occidentales, provocando que las demencias de manera general y de manera particular la enfermedad de Alzheimer, sean consideradas un grave problema de salud (Ertekin-Taner et al., 2004) (Fig. 1).

El diagnóstico clínico está actualmente basado en los síntomas registrados en la entrevista con los pacientes y familiares, en la exploración del médico al paciente y en el uso de marcadores biológicos que permiten un diagnóstico precoz. Para considerar una detección de la enfermedad en las fases

más tempranas de la enfermedad se ha incluido el término deterioro cognitivo leve (mild cognitive impairment (MCI)) para indicar una situación con alto riesgo de desarrollar demencia, con fallos en la memoria y/o en otras funciones cognitivas, a menudo notado también por familiares. El individuo MCI no posee problemas en su actividad diaria pero si aparecen en test objetivos psicológicos indicadores de posible demencia futura.

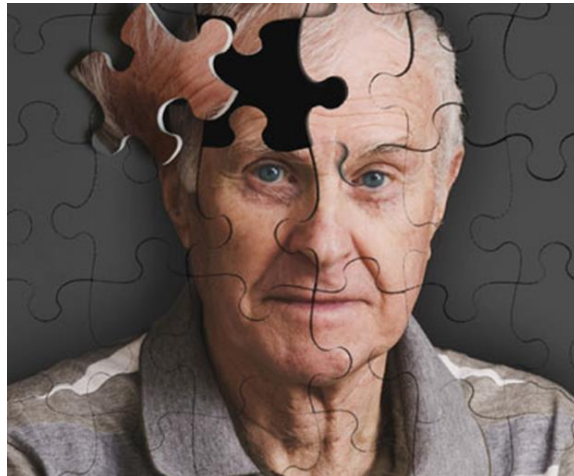


Figura 1: Demencia Senil

Fuente: <https://www.tavad.com/blog/demencia-senil>

Existen diferentes tipos de demencia y su detección es solo el primer paso ya que después se seguirá con la búsqueda de la causa. Hay más de setenta enfermedades que pueden ocasionar demencia, la demencia de Alzheimer que nos ocupa (la de mayor prevalencia), por cuerpos de Lewy, la demencia

que aparece en la enfermedad de Parkinson, por problemas vasculares (segundas en importancia después de Alzheimer) (Knopman et al., 2000), por causas infecciosas como la demencia que acompaña al SIDA, por neurosífilis, por la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia-alcohol, demencia detectada tras hipotiroidismo, por hidrocefalia normopresiva, etc. Cabe destacar que también se detectan demencias mixtas, como la que presentan pacientes con Alzheimer y Parkinson a la vez (Green R, 2009).

La demencia senil es aquella que se da en personas de edad avanzada. Las demencias preseniles son las que se dan en personas de menos de 65 años y pueden ser en todo similares a la demencia senil. La edad avanzada está relacionada con un mayor riesgo de padecer demencia y por eso las personas con más de 90 años la padecen pero no todos los ancianos acaban teniendo una demencia. Por lo tanto, es difícil ver cuando se producen cambios cognitivos propios del envejecimiento cerebral o cuando estos son constituyentes de una enfermedad, como la de Alzheimer.

En personas sin enfermedad conocida se detectan cambios cognitivos asociados a la edad, que son leves y que afectan a la memoria y a la rapidez de respuesta cerebral. Es

normal la dificultad de recordar nombres de cosas o hechos vividos recientemente.

1.3 EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso resulta necesario para conocer el medio que nos rodea y el medio interno (Gage, 2000). Nos permite pensar, memorizar y actuar ante peligros, deseos, etc. El cerebro es la parte con mayor volumen y complejidad del sistema nervioso. Nos permite procesar la información y regular todo el funcionamiento del organismo. Existe dentro del sistema nervioso central (SNC), el encéfalo y la médula espinal, que nos permite procesar la información y regular todo el funcionamiento del organismo. En el SNC se realiza el procesamiento de la información y se encarga, además, de recoger y transmitir la información al sistema nervioso periférico, donde se encuentran los nervios craneales y espinales. El encéfalo se divide en tres partes conectadas, el cerebro, el cerebelo y el tronco del encéfalo (mesencéfalo, protuberancia y bulbo). La corteza cerebral es la principal masa del cerebro y se divide en dos hemisferios cerebrales conectados por el cuerpo calloso y con circunvoluciones, surcos y cisuras (Fig. 2).

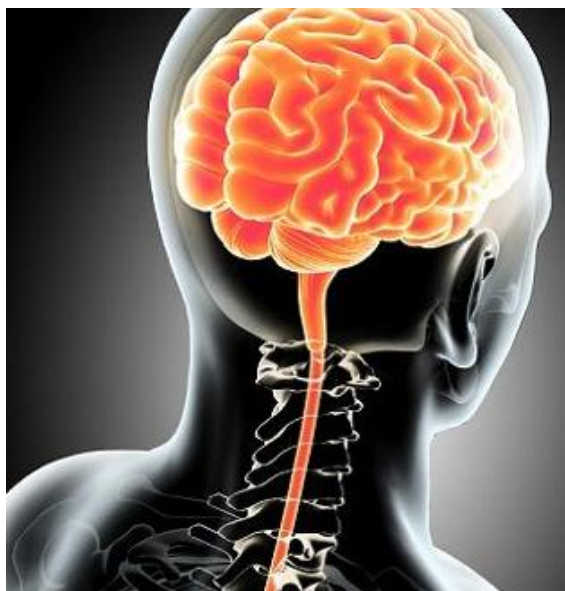


Figura 2: Sistema Nervioso Central

Fuente: <https://www.psicoactiva.com/blog/sistema-nervioso-central-estructura-funciones-enfermedades>

El cerebro humano se compone de distintos tipos celulares que se clasifican según su apariencia y funcionalidad. Las células neurales que forman el sistema nervioso central se dividen principalmente en neuronas y glia (Del Rio-Hortega, 1957). Dentro de la glia podemos distinguir los astrocitos, la microglia y la oligodendroglia (Volterra and Steinhäuser, 2004). Es de una gran complejidad con neuronas y glia interconectando en todo momento, lo que favorece la funcionalidad óptima de este órgano (Reynolds and Weiss, 1992).

Durante muchos años se ha dado un papel preponderante a las neuronas con poca o nula importancia al resto de células cerebrales. Hoy en día sabemos que la microglia es de origen no neural y representa la inserción cerebral de monocitos sanguíneos que posteriormente se transformaron en los macrófagos tisulares cerebrales. Su función, por lo tanto, es la de protección cerebral frente a agentes externos dañinos. Respecto a los oligodendrocitos se encargan de constituir la mielina que protege el axón neuronal para agilizar la comunicación intercelular (Kondo and Raff, 2000). Los astrocitos se encargan, entre multitud de funciones, de controlar el ambiente interno del sistema nervioso central (SNC) transfiriendo nutrientes de los vasos sanguíneos a las neuronas y eliminando los productos de deshecho y manteniendo así el medio electroquímico adecuado para las neuronas (Aschner and Kimelberg, 1991). Todos los tipos de células gliales constituyen el 50% del volumen total del cerebro siendo el origen de la mayoría de los tumores cerebrales, como el glioblastoma y el cáncer de células neuronales no diferenciadas (neuroblastoma). Respecto a las neuronas están especializadas en recibir información, transmitir impulsos e influir en otras neuronas o tejidos efectores.

En el cerebro humano hay alrededor de 100 mil millones de neuronas encargadas de diferentes funciones cerebrales,

como el control motor, la memoria, la ira, la huida, etc. (Chen and Swanson, 2003; Haines, 2015; Squire et al., 2006).

1.3.1 FUNCIONES CONGNITIVAS

El cerebro humano puede realizar funciones extremadamente complicadas y sofisticadas. Todas ellas se enmarcan dentro de lo que se conoce como funciones cognitivas o corticales porque las neuronas que realizan esas funciones están situadas en la corteza cerebral (Zarranz, 2013).

Las funciones cognitivas más importantes son:

- La memoria
- El lenguaje
- Las praxias
- Las funciones ejecutivas
- La percepción y el reconocimiento (Gnosias)

1.3.1.1 LA MEMORIA

Nos permite almacenar los aprendizajes realizados, los hechos vividos, las experiencias y la capacidad de recuperar

toda la información grabada en nuestro cerebro. Se habla de la memoria implícita o no consciente y la memoria explícita o consciente. Además, esta última se divide en memoria episódica y la memoria semántica que almacena conceptos o de conocimientos generales. Básicamente la capacidad de recordar una conversación de hace unos días depende de la memoria episódica, mientras que saber el significado de la palabra “gato” o el pH de la sangre, depende de la memoria semántica (Fig. 3).



Figura 3: Memoria cerebral

Fuente: <http://cdcalipso.com/wordpress/la-memoria-sincro>

La memoria no se encuentra en un lugar determinado en el cerebro sino que depende de numerosas estructuras cerebrales que se interconectan. Cuando se habla de trastornos de memoria, se quiere indicar la presencia de alteraciones de la memoria episódica, con dificultad para recordar hechos ya vividos en el pasado más o menos reciente y para aprender información nueva. La memoria episódica es la función cognitiva más precozmente afectada en la enfermedad de Alzheimer (Knopman et al., 2018).

1.3.1.2 EL LENGUAJE

El lenguaje es la capacidad para comunicarse que poseemos mediante signos complejos, no solo hablados sino por una variedad importante de formas como: la escritura, las matemáticas, la música, el lenguaje informático, etc. En el lenguaje intervienen estructuras del hemisferio dominante, que es el izquierdo en la mayoría de las personas. En este hemisferio existen dos áreas importantes para el lenguaje. El área de Wernicke en el lóbulo temporal que permite la comprensión del lenguaje, y el área de Broca en el lóbulo frontal que controla la emisión del lenguaje y su fluidez, y las dos son capaces de interconectar. La alteración del lenguaje

denominada afasia, según el área lesionada donde se produzca tendrá unas características diferentes.

En la afasia de Wernicke el enfermo presentará dificultades para comprender el lenguaje, mientras en la afasia de Broca el paciente tiene un lenguaje titubeante, simple, con poca fluidez, pero su comprensión es perfecta. La afasia se puede producir por una lesión cerebral localizada que afecta a una o varias de las estructuras implicadas en el lenguaje, como sería el caso de un infarto cerebral o un tumor, o deberse a un proceso degenerativo global cerebralmente, como en las demencias (Mesulam et al., 2014).

1.3.1.3 LAS FUNCIONES EJECUTIVAS

Son las habilidades que permiten la anticipación, la planificación de actividades, el establecimiento de metas, la programación, la autorregulación de tareas y la habilidad de llevar a cabo eficientemente dichas tareas. Además, gracias a las funciones ejecutivas se puede controlar los cambios que pueden producirse en el entorno, adaptarse al ambiente cambiante e incluso prevenir dichos cambios. Es el lóbulo frontal el que controla estas funciones ejecutivas, también la

personalidad, la motivación y la conducta de cada uno. Los individuos que presentan daños en el lóbulo frontal tienen problemas a la hora de planificar sus actos, conductas repetitivas, no son capaces de aprender de los errores cometidos y poseen problemas para resolver dificultades que los cambios les producen. Además, presentan cambios patológicos en el comportamiento, reacciones algunas veces agresivas y otras pasivas y por lo tanto con descontrol de los impulsos. En la demencia frontotemporal predominan las alteraciones de la conducta y de las funciones ejecutivas (Limoli et al., 2018).

1.3.1.4 LA PRAXIA

La función cognitiva que permite realizar motricidad y gestos voluntarios complejos aprendidos, se denomina praxia. Para realizar actos motores complejos aprendidos previamente se necesita la planificación y la coordinación de actos motores más sencillos y de manera correcta. Para ello es necesaria la participación del lóbulo frontal, que permite la decisión de realizar el movimiento. Después pasa al lóbulo parietal dominante, que posee las áreas asociativas, donde se encuentran las instrucciones motoras que caracterizan los diferentes actos motores (Fig. 4). En las áreas asociativas se

prepara el acto motor analizándose toda la información. Cuando el acto motor está ya planificado se transmite a las áreas del cerebro que distribuyen la información por medio de las vías nerviosas, como la médula y los nervios periféricos, hasta los músculos que van a intervenir en el movimiento. Además, las zonas asociativas del lóbulo parietal intervienen en la discriminación de los gestos después de la comprensión de los mismos. Un ejemplo sería: si un individuo quiere aplaudir, las áreas asociativas preparan el movimiento para mover la mano izquierda y luego, casi al unísono, la mano derecha. Las áreas motoras se encargarán de enviar las órdenes para producir la contracción de los músculos (Allan et al., 2011) (Fig. 4).

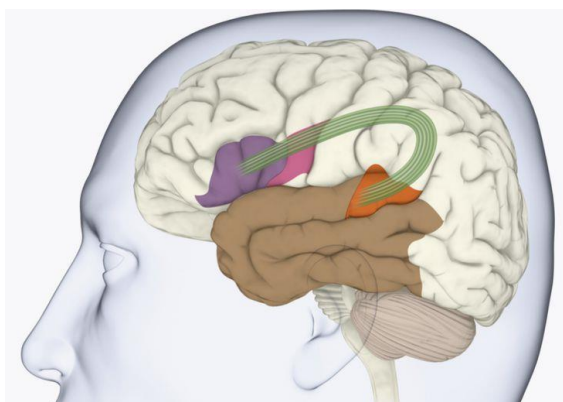


Figura 4: Área de Broca y de Wernicke

Fuente: <https://www.psicoactiva.com/blog/area-broca-localización-función>

La incapacidad para realizar movimientos voluntarios o gestos complejos de manera correcta sin que haya parálisis que pueda afectar a los músculos que van a realizar la acción se denomina apraxia (Bartolo et al., 2007). El enfermo conserva su capacidad para mover la musculatura y su contracción pero es incapaz de planificar el movimiento de manera correcta. Se produce una acción motora no apropiada con movimientos sin continuidad (Lesourd et al., 2013). Existen diferentes apraxias dependiendo del área cerebral involucrada, apraxia motora, ideatoria e ideomotora. Además, pueden existir apraxias que afecten actos motores concretos como la apraxia de la marcha, de la danza, de vestirse, entre otras. La apraxia se detecta de forma precoz en las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer (Cacabelos, 1999).

1.3.1.5 LA GNOSIA

La percepción y el reconocimiento intervienen en las gnosias. Esta es la capacidad que permite percibir el entorno y reconocerlo identificándolo con un contenido semántico aprendido con anterioridad. De esta manera comprendemos lo que está ocurriendo en nuestro entorno. Las áreas corticales primarias son las encargadas de las modalidades sensoriales, como el lóbulo occipital para la visión, el lóbulo temporal para

la audición o el parietal para el tacto, entre otros. Las áreas asociativas de cada área cortical primaria situadas en la confluencia de los lóbulos parietal, occipital y temporal, permiten dar nombres a aquello que se percibe (Chitnis and Weiner, 2017). Es importante destacar la agnosia visual, en ausencia de ceguera, donde existe incapacidad para reconocer de manera visual un objeto previamente conocido. En el Alzheimer y en otras enfermedades de demencia, se aprecia claramente esta agnosia ya en las fases moderadamente avanzadas de la enfermedad, produciéndose, por ejemplo, el no reconocimiento de una llave que abre una puerta, pero viendo que es algo de color gris de forma puntiaguda. También existe la agnosia auditiva pero esta es menos frecuente. En ella se produce la incapacidad de reconocer estímulos previamente conocidos. La agnosia táctil todavía es más rara, entre muchas otras.

1.3.2 CRONOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La primera zona cerebral dañada en la enfermedad de Alzheimer es la corteza entorrinal, que se denomina la fase de estadio temprana o entorrinal de la enfermedad (Suhonen et al., 1996). Posteriormente y conforme aumenta el número de

lesiones en esta corteza entorrinal, se ve afectado el hipocampo y las zonas límbicas (estadio límbico). En último lugar se ve involucrada la neocorteza, denominado el estadio isocortical (Metsaars et al., 2003). De esta manera, esta clasificación de la enfermedad permite conocer la progresión de las lesiones que tienen lugar de una manera temporal cronológica en los enfermos de Alzheimer, ayudando al clínico para obtener una buena correlación clínica. Esto se explica ya que el estadio entorrinal es asintomático. En el estadio límbico el paciente presenta un discreto deterioro cognitivo y en el estadio isocortical se asocia con un deterioro severo y con la demencia (Cacabelos, 1999; González et al., 2017) (Fig. 5).

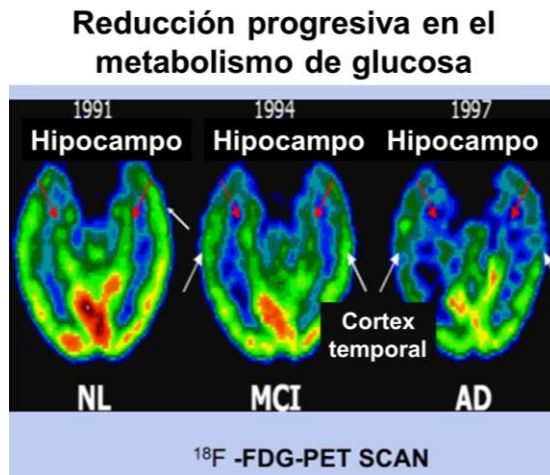


Figura 5: Cronología de la enfermedad de Alzheimer

Fuente: <http://neurosciencenews.com/neurology-alzheimers-mw108-neurodegeneration-267>

1.4 TIPOS DE CÉLULAS EN EL CEREBRO

En el cerebro existen diferentes células que lo caracterizan. La división más admitida es la división según el origen celular. Por lo tanto se dividen en células neurales y no neurales. Las primeras tienen un origen neural y las segundas no son propias de este origen. Dentro de las células neurales tenemos los astrocitos, las neuronas y la oligodendroglia, por ejemplo. Dentro de las células no neurales tenemos a la microglia, cuyo origen es diferente ya que son células diferenciadas procedentes de monocitos de la sangre indiferenciados.

1.4.1 NEURONAS

El científico español Santiago Ramón y Cajal (Cajal, 1913) logró describir por primera vez los diferentes tipos de neuronas en forma aislada. Al mismo tiempo planteó que el sistema nervioso estaba constituido por neuronas individuales que se comunicarían entre sí a través de contactos funcionales llamados sinapsis (Teoría neuronal). La hipótesis de Cajal se oponía a la de otros científicos de su época que concebían al sistema nervioso como una amplia red de fibras nerviosas conectadas entre sí formando un continuo (en analogía a los

vasos sanguíneos). Consiguió que el científico más prestigioso de su época, Albert von Kölliker, aceptase que los axones y las dendritas de distintas neuronas no contactaban entre sí (sinapsis química). A partir de ese momento fue universalmente aceptada la propuesta de Cajal (Doctrina de la neurona, actualmente Teoría Neuronal) (Cajal, 1913). De todas maneras, también fue aceptada la propuesta de que existía un continuo entre las diferentes neuronas lo que actualmente se conoce como la sinapsis eléctrica neuronal.

La neurona o célula nerviosa está formada por un soma (cuerpo neuronal o pericarion) de un tamaño aproximado de 5 a 100 micras (Fig. 6). Es el centro metabólico que junto con un gran número de mitocondrias refleja el gran consumo de energía y síntesis de proteínas realizadas por la neurona. El núcleo contiene cromatina difusa (eucromatina) y un nucléolo visible. En el citoplasma, los ribosomas son abundantes y el retículo endoplásmico rugoso (RER) es basófilo debido a la gran cantidad de ARN ribosómico unido a su membrana ("*grumos de Nissl*"). El complejo de Golgi está muy desarrollado, comparándolo con otros tipos celulares, con la cantidad de neurotransmisores que se producen en las neuronas para permitir la comunicación interneuronal y de comunicación con la glia. Del soma parten prolongaciones denominadas dendritas que pueden comunicarse a nivel

sináptico con el axón de otras neuronas, con dendritas de otras neuronas o con la glia. Suelen ramificarse profusamente en las proximidades del soma adoptando forma arborescente en muchos de los casos.

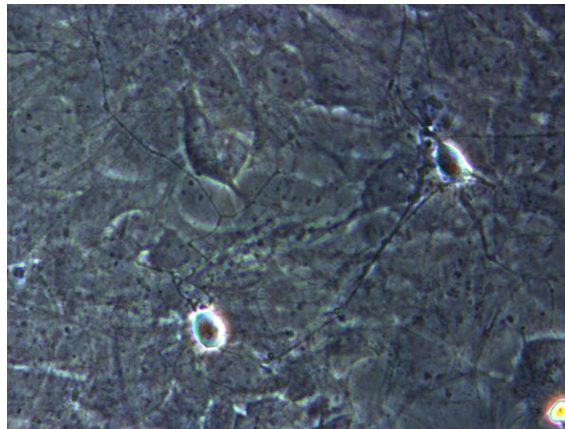


Figura 6: Neuronas mediante contraste de fases

Fuente: Grupo investigación Dra. Vallés

La información se transmite desde la parte distal a la proximal para confluir en el soma y continuar por el axón. Esta prolongación única y de mayor longitud contiene un citoplasma con densos haces de microtúbulos y neurofilamentos que actúan como elementos estructurales y también desempeñan un papel clave en el transporte de metabolitos y orgánulos a lo largo del axón, como la proteína MAP-2, característica de neuronas. Las neuronas presentan ribosomas y los axones terminan en ramas finas llamadas campos terminales, que

corresponden a los puntos de contacto funcional o sinapsis, eléctricas o químicas. Las agrupaciones de somas que comparten funciones específicas se denominan núcleos y constituyen la sustancia gris del SNC. La sustancia blanca consta de haces de axones envueltos por una lipoproteína aislante, llamada mielina (Haines, 2015; Squire et al, 2006) (Fig. 7). Las neuronas se clasifican en tres grandes tipos, en función de la forma del soma y el tipo de prolongaciones que emergen. Estos tipos de células son: monopolares, bipolares y multipolares.

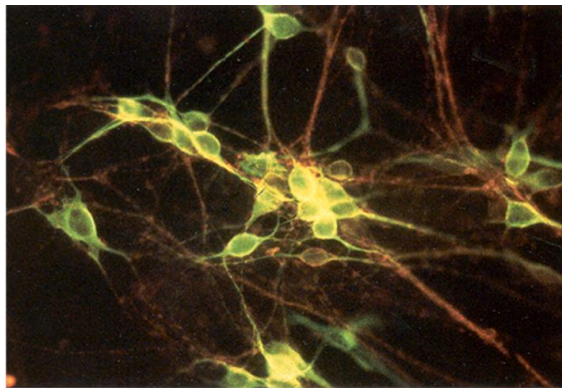


Figura 7: Inmunofluorescencia MAP-2+TRICT (rojo)

Fuente: ©2018 Washington University in St. Louis

1.4.1.1 SINAPSIS NEURONAL

La transferencia de información entre una neurona y otra se lleva a cabo en lugares especializados estructural y

funcionalmente llamados sinapsis, la cual puede ser química o eléctrica. Es en este lugar donde una prolongación de una neurona (zona terminal del axón) se comunica con una segunda neurona (por el axón, dendritas o cualquier otra zona de la neurona postsináptica) o bien con neuronas efectoras que pueden ser musculares o glandulares.

En la sinapsis eléctrica hay una conexión que proporciona un puente de baja resistencia entre dos células nerviosas, por medio de proteínas de unión. La información puede fluir en ambos sentidos y no existe retardo sináptico. Sin embargo, los canales iónicos no siempre están abiertos y pueden ser modulados por el pH intracelular, por el Ca^{2+} , por segundos mensajeros y por neurotransmisores (Haines, 2015; Squire et al, 2006).

Las sinapsis más frecuentes en el SNC son las de tipo químico donde la comunicación interneuronal se realiza con la producción y excreción al botón sináptico de mediadores químicos, captados por las neuronas postsinápticas mediante receptores específicos (Fig. 8).

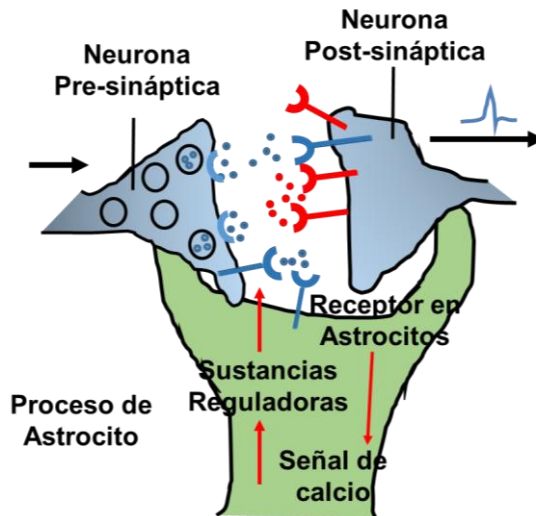


Figura 8: Relación neuronas y astrocitos

Fuente: Adrián Jordá

Las neuronas en reposo presentan una determinada carga eléctrica en su interior, diferente a la extracelular. Es el potencial de reposo que normalmente se encuentra en torno a los -70 mV en las neuronas. Con este potencial de reposo las neuronas se encuentran hiperpolarizadas. Si la célula recibe un impulso eléctrico suficiente para superar el umbral se producirá un potencial de acción, es decir, un impulso nervioso que recorrerá el axón permitiendo la liberación del neurotransmisor o neuromodulador. Estos últimos están almacenados en el botón pre-sináptico en las llamadas vesículas sinápticas y se liberarán al espacio sináptico o hendidura sináptica, mediante la fusión de estas vesículas con la membrana plasmática del

axón, en los denominados campos terminales o botones terminales (Haines, 2015; Squire et al, 2006; Luján, 2017) (Fig. 8).

En el potencial de acción, la carga eléctrica de la neurona se eleva hasta 50 ± 10 mV, lo cual producirá una despolarización de la membrana celular. Posteriormente, el potencial de reposo se mantiene debido a los gradientes químicos, eléctricos y a la acción de la membrana plasmática y las moléculas introducidas en ellas, como la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, que actúa contra gradiente de concentración, introduciendo iones de K^+ en la célula y eliminando al exterior celular iones de Na^+ . Mediante estos mecanismos se mantiene el potencial de reposo de la membrana (Luján et al., 2016). Una vez liberados los neurotransmisores por la célula pre-sináptica deben interactuar con la neurona post-sináptica o con la neurona efectora, para transmitir la información. La membrana de la neurona post-sináptica contiene receptores con afinidad por el neurotransmisor.

La mayoría de los receptores de membrana son cadenas glucoprotéicas que atraviesan la capa lipídica y transforman la señal química extracelular, en un cambio funcional en la neurona (o célula efectora). Los neurotransmisores son sustancias químicas compuestas de moléculas pequeñas de

menos de 10 átomos de carbono y de moléculas grandes, de más de 10 átomos de carbono. Al grupo de pequeñas moléculas pertenecen las aminas-biógenas (acetilcolina, dopamina, noradrenalina); los aminoácidos (GABA, ácido glutámico y glutamato); los nucleótidos (adenosina y ATP); y moléculas grandes como los neuropéptidos (sustancia P, casinina, glucagón, vasopresina y oxitocina).

La inmensa mayoría de la comunicación entre las células del sistema nervioso se realiza por neurotransmisores aminoácidos GABA con efectos predominantemente inhibitorios. Participan en procesos de tipo coordinador o integrador a niveles motores y cognitivos, así como en importantes trastornos neurológicos y psiquiátricos como la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, la discinesia tardía y los trastornos del sueño. Por otra parte los astrocitos también son células GABA érgicas que modulan la actividad de la microglia (Lee et al., 2011; Fraser et al., 1994). El neurotransmisor glutamato media en la mayoría de las transmisiones excitatorias. La unión a sus receptores permite el paso de iones de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} produciendo una despolarización de la neurona postsináptica (Rao et al., 2001; Yamamoto et al., 2013). La liberación y difusión del neurotransmisor desde la terminación presináptica lleva un tiempo, por lo que se dará un retraso sináptico entre la llegada

del potencial de acción sináptico y el inicio de la corriente sináptica en la neurona post-sináptica. A nivel más específico, los receptores se pueden agrupar según el tipo de neurotransmisor químico que los activen.

Se denominan receptores colinérgicos los que responden a la acetilcolina (Fig. 9) (Van Der Zee et al., 1993), siendo de dos tipos, nicotínicos y muscarínicos y los llamados receptores adrenérgicos o adrenorreceptores, que serán activados por las catecolaminas (adrenalina o noradrenalina) clasificados en adrenorreceptor α (subtipos: α_{1a} , α_{1b} , α_{1d} , α_{2a} , α_{2b} y α_{2c}) y β (subtipos: β_1 , β_2 , β_3 y β_4).

- Poro de entrada al canal iónico del receptor
- Canal iónico
- Estructuras formadas por aminoácidos cargados negativamente que determinan la selectividad del canal a determinados iones
- Ach
- Iones de sodio
- Iones de potasio
- Iones de calcio

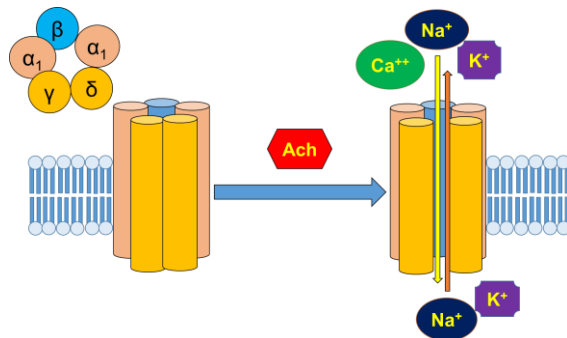


Figura 9: Receptor-canal de acetilcolina (ACh)

Fuente: Adrián Jordá Vallés

Los receptores colinérgicos nicotínicos son receptores iónicos que sufren un cambio de estructura cuando son

activados por la acetilcolina permitiendo el ingreso de iones de Na^+ provocado una despolarización de la célula receptora. Se subdivide en receptores N_1 o N_M ubicados en la unión neuromuscular y los N_2 o N_N localizados en el sistema nervioso autónomo (ganglios colinérgicos y adrenérgicos).

Los receptores que responden al mismo neurotransmisor se clasificarán en subtipos que desencadenarán diferentes respuestas. El receptor nicotínico (nAChRs) es una proteína transmembrana compuesta por cinco subunidades proteicas de canal no homólogas (2α , 1β , 1γ , 1δ) (Fig. 9 y 10), y cada una de ellas posee cuatro regiones hidrófobas que atraviesan la membrana. El punto de unión de Ach (Acetil colina) se encuentra en el núcleo central (ocupando las 2α) (Fig. 10).

Cuando dos moléculas de Ach se unen a las dos subunidades α se produce un cambio estructural que permite la entrada a favor de gradiente de Na^+ y Ca^{2+} y la salida de K^+ , produciéndose una despolarización parcial que es insuficiente para evocar un potencial de acción en la célula muscular que activa los canales de Na^+ dependientes de voltaje que rodean a la placa motora. Su apertura consigue despolarizar la membrana lo suficiente como para producir un potencial de acción a lo largo de la fibra muscular (Rao et al., 2001).

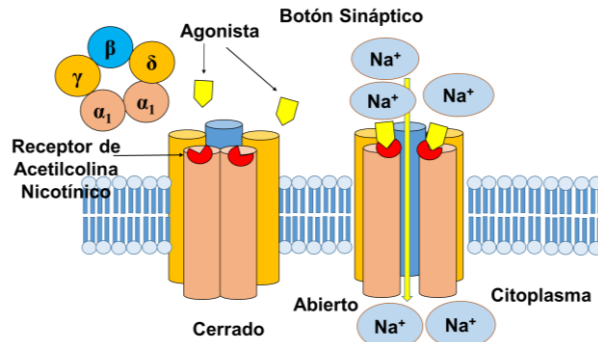


Figura 10: Receptor nicotínico de la ACh

Fuente: Adrián Jordá

Los receptores colinérgicos muscarínicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR's) y constituyen la familia más grande de proteínas integrales de membrana. Está formada por una cadena polipeptídica simple con 7 segmentos α -hélice transmembranales que tienen una estructura tridimensional común, son también conocidos como receptores de 7 dominios transmembranales (TM 1-7) o receptores heptahelicoidales. Estos dominios están unidos entre sí por *loops*: 3 intracelulares (iL₁-iL₃), un *loop* largo compuesto básicamente por aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6 (iL₃), el cuál es el sitio de interacción o acoplamiento a proteína G, 3 *loops* extracelulares (eL₁-eL₃) y 1 segmento N-terminal glicosilado en el dominio extra celular. Se puede formar un cuarto *loop* en el segmento C-terminal. Se han identificado cinco sub tipos: M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ (Tabla 1) (Levey, 1996. Haines, 2015; Luján et al., 2016). Existen

diferentes tipos de neuronas según su lugar de localización celular y sináptica (Tabla 1).

Subtipo molecular	Abundancia Regional	Localización Celular	Localización Sináptica
M₁	Cerebro anterior (neo córtex, neo estriado e hipocampo.	Neuronas piramidales y piramidales estriatales.	Post ->> Pre-sináptica
M₂	Moderada abundancia en cerebro.	Neuronas no piramidales en córtex e hipocampo	Pre ->> Post-sináptica
M₃	Bajos niveles en cerebro, abundante en hipocampo.	Neuronal	Post ->> Pre-sináptica
M₄	Abundante en neo estriado, moderado en hipocampo y córtex.	Neuronas estriatales espinosas.	Pre ->> Post-sináptica
M₅	Bajos niveles en todo el cerebro.	Neuronas piramidales, materia negra, microglia.	Post ->> Pre-sináptica

Tabla 1: Cerebro y receptores muscarínicos

Fuente: Modificada de Levey, (1996).

1.4.1.2 PLASTICIDAD NEURONAL

La plasticidad cerebral consiste en la adaptación funcional del SNC para minimizar los efectos de las alteraciones estructurales o fisiológicas, la regeneración anatómica o funcional y adaptación a nuevas situaciones que han lesionado el SNC (Xu et al., 2016). Los mecanismos por los que se llevan a cabo los fenómenos de plasticidad son histológicos, bioquímicos y fisiológicos. La plasticidad anatómica de las neuronas es un fenómeno común en la sinapsis, a las que tanto la estimulación fisiológica como las condiciones del entorno darán origen a cambios morfológicos. La plasticidad del axón es un fenómeno específico que se aprecia después de una lesión y es más pronunciada durante la primera infancia. Así ocurre en niños con parálisis cerebral, donde la lesión del tracto cortico-espinal de un lado puede ser compensada por el tracto contralateral o ipsilateral de los músculos afectados. El mismo fenómeno, aunque en menor cantidad ha podido ser demostrado en épocas muy posteriores a la neonatal, incluso en adultos.

La plasticidad axonal y sináptica no tendría utilidad práctica si el ciclo funcional no se completara por la acción de los neurotransmisores específicos. El sistema N-metil-D-aspartato (NMDA) (Zhou et al., 2010; Zhou et al., 2014), receptores para glutamato que se concentran en la membrana

postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas, está implicado en los mecanismos de facilitación intercortical y en los procesos de aprendizaje y memoria y su inhibición bloquea la capacidad del córtex cerebral (Shihabuddin et al., 2000). Los astrocitos son capaces de expresar los receptores NMDA tal y como lo hacen las neuronas (Lee et al., 2010).

Actualmente ya se conoce la clara implicación de los receptores inotrópicos de glutamato (NMDA y AMPA) en procesos patológicos, como la privación de oxígeno (anoxia) en el tejido neuronal produciéndose daño celular isquémico, en las neuronas y en las células gliales con la consiguiente liberación de radicales libres neurotóxicos y aumento de inflamación (Rossi et al., 2000; Gutteridge and Halliwell, 1992). Esta disminución de energía afectará al metabolismo celular (Könner and Brüning, 2011), a las bombas iónicas y a la capacidad de las neuronas de mantener un potencial de membrana en reposo. Como resultado, la despolarización desencadenará potenciales de acción y la posterior liberación de glutamato desde las neuronas pre-sinápticas a la hendidura, activándose los receptores NMDA y AMPA. También, a través de los receptores NMDA y de los canales de Ca^{2+} (dependiente de voltaje), se producirá la entrada de Ca^{2+} lo que desencadenará en una cascada de segundos mensajeros. Las neuronas perderán la capacidad de mantener el potencial de

reposo, lo que llevará al daño celular o a la muerte neuronal (Haines, 2015; Luján et al., 2016). El tono inhibitorio mediado por el sistema gabaérgico (GABA) es revertido por los cambios neuroquímicos que siguen a la lesión, donde está implicado el glutamato. A nivel farmacológico, la administración de un agente bloqueante (antagonista) del receptor de NMDA protege de los daños al hipocampo y al núcleo estriado, regiones más frecuentemente dañadas por la interrupción del riego sanguíneo y la consiguiente anoxia neuronal (Luján et al., 2016).

El sistema colinérgico se relaciona con el sistema glutaminérgico y con la morfogénesis cortical, mientras que el sistema serotoninérgico y concretamente el receptor 5-HT_{2A}, que se expresa en todas las neuronas del córtex, se relaciona con la formación y mantenimiento de nuevas sinapsis. Además, la disminución de los niveles de serotonina y Ach reduce drásticamente el número de sinapsis en la zona del hipocampo. Por otra parte, la eficacia en la liberación de los neurotransmisores juega un papel importante en la plasticidad sináptica.

La sinapsina 1 (SYN1) interviene en la regulación de la exocitosis de las vesículas de los neurotransmisores. Es una fosfoproteína específica cuya vía de fosforilización es un

componente vital en los mecanismos que intervienen en la plasticidad sináptica y contribuyen a la base celular del aprendizaje y de la memoria.

La neurogénesis es un proceso primordial en la recuperación cerebral tras daño o en determinadas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, los cuerpos de Lewis, etc. (Temple and Alvarez-Buylla, 1999; Temple, 2001) (Fig. 11).

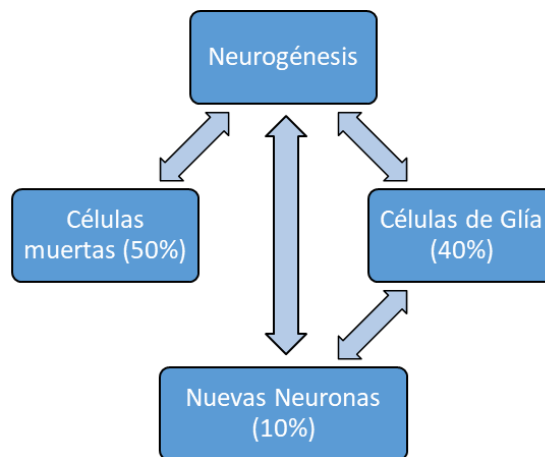


Figura 11: Neurogénesis

Fuente: Adrián Jordá (2018)

La base fisiopatológica de toda esta recuperación hay que buscarla en la capacidad de la glía dañada para generar señales que faciliten o inhiban el crecimiento axonal y el proceso de proliferación de células madres nerviosas

(neurogénesis) (Rakic, 2002; Shihabuddin et al., 1997) (Fig. 12) que se encuentran en las zonas remanentes de la zona subgranular del hipocampo y las zonas ventricular y periventricular de los ventrículos laterales, adyacentes al núcleo estriado (Bernabeu-Zornoza et al., 2018) (Fig. 12).

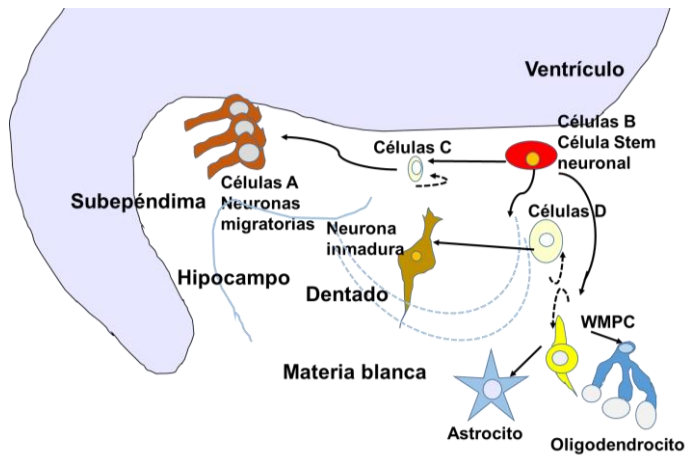


Figura 12: Proceso de Neurogénesis en el hipocampo

Fuente: Adrián Jordá (2018) de Antes Goldman 2003

1.4.2 CÉLULAS GLIALES

Las células gliales constituyen una población heterogénea de células no neuronales. A diferencia de las neuronas no propagan potenciales de acción ni sus prolongaciones están especializadas para recibir y transmitir señales eléctricas. Son el soporte estructural y mantienen un

microambiente adecuado para la función neuronal. Suponen la mayor parte del sistema nervioso y son necesarias para el funcionamiento cerebral (Haines, 2015) (Fig. 13).

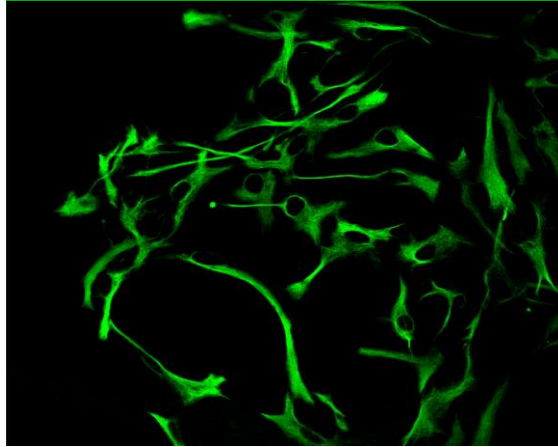


Figura 13: Astrocitos teñidos con GFAP+FIFT (verde)

Fuente: Laboratorio Dra. Vallés

Los tipos fundamentales en el SNC son los astrocitos y los oligodendrocitos (derivados del neuroectodermo) y la microglía, derivado del mesodermo (Ndubaku and de Bellard, 2008). La glía y las neuronas pueden producir citocinas proinflamatorias como las interleucinas: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 y IL-16, bajo el efecto de las caspasas inflamatorias. La acción de estas caspasas puede promover la activación de

rutas de muerte apoptótica (Becerra, 2009; King et al., 2017; Wei and Jonakait, 1999).

Las células más abundantes en el SNC son los astrocitos, seguido de las neuronas, la oligodendroglia y por último la microglia.

1.4.2.1 ASTROCITOS

Son células muy ramificadas y muchas de sus prolongaciones terminan en dilataciones llamadas “*pies astrocíticos*”, se unen para revestir completamente la superficie de contacto entre el SNC y otros tejidos. Cada vaso sanguíneo está cubierto por una capa de “*pies astrocíticos*” perivasculares (“*pies chupadores*”) que lo separa del tejido nervioso. (Fig.13). Se diferencian dos tipos de astrocitos (Fig. 14), los protoplasmáticos o astrocitos de la sustancia gris, con una simetría radial, y los astrocitos fibrosos que contienen filamentos intermedios o prolongaciones que siguen la dirección de los tractos de la sustancia blanca. Los astrocitos fibrosos se diferencian de los protoplasmáticos por sus canales iónicos, sus receptores de neurotransmisores y su sistema de captación (Haines, 2015), además expresan GFAP y presentan ramificaciones cortas. Los astrocitos protoplasmáticos

presentan procesos más largos y abundantes con formas más complejas y extremadamente elaboradas. No expresan comúnmente niveles detectables de GFAP y se encuentran en contacto con los vasos sanguíneos y con las neuronas adyacentes.

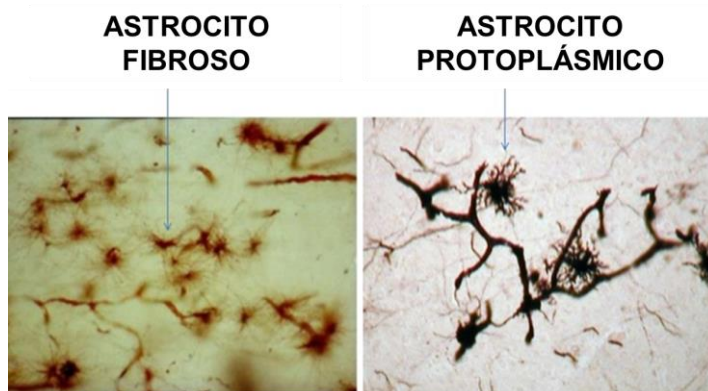


Figura 14: Astrocito Fibroso y Protoplásmico

Fuente: <https://www.slideshare.net/anahi73/repaso-imagenes-histologicas-de-tejido-nervioso>

La membrana celular de los astrocitos es permeable en exclusiva al catión de potasio (K^+) que es captado con facilidad principalmente a nivel de los pies vasculares o “podocitos” mediante un mecanismo efectivo de autorregulación de flujo sanguíneo cerebral, impidiendo así acumulación de este ión que dañaría la función neuronal. Los astrocitos cumplen por lo tanto una función de control de la memoria y del aprendizaje al

controlar la cantidad de potasio libre en el botón sináptico. Los astrocitos no solo se comunican y sirven de soporte a las neuronas sino a otros tipos celulares como la oligodendroglía. De esta manera se comprende la gran cantidad de astrocitos existente en el cerebro en comparación con neuronas y otros tipos celulares (Fig. 15).

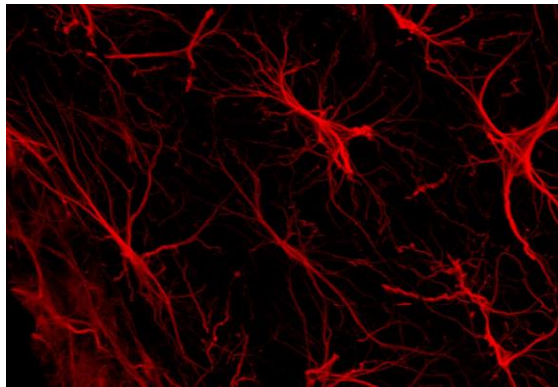


Figura 15: Astrocito fibroso, fluorescencia confocal

Fuente: <http://www.wesapiens.org/es/search/?text=Astrocito+Fibroso>

Los astrocitos están conectados entre sí a través de uniones estrechas formándose entre ellos un amplio sincitio funcional, con posibilidad de perder en una región el K^+ que ha ganado en otra región, lo que se denomina “*buffer espacial of K^+* ”. Estas células neurales participan también en la metabolización de los neurotransmisores. Sus membranas poseen receptores y sustancias neuroactivas y un sistema de

captación para otras sustancias, poniendo fin al efecto postsináptico de algunos neurotransmisores al eliminarlos de la hendidura sináptica. Los astrocitos pueden captar e inactivar el aminoácido glutamato gracias a la enzima glutamina sintetasa, formando la glutamina que es liberada por el astrocito y se convertirá en glutamato en el interior de las neuronas (Fu et al., 2010; Perea and Araque, 2007; Haines, 2015). Otra de las funciones realizada por los astrocitos es ayudar a establecer y mantener la barrera hematoencefálica (BHE), por medio de las interacciones con las células endoteliales, regulando la expresión y la función de distintos transportadores endoteliales como el transportador de glucosa 1 (GLUT1), el transportador de aminoácidos neutros (LAT1) y el transportador de aminoácidos excitatorios 1-3 (EAAT 1-3) (Abbott et al., 2006). Los mediadores químicos como el glutamato, el aspartato, el adenosin tri-fosfato (ATP), el óxido nítrico (NO), la proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) o el caquectina e interleuquina 1 beta (IL-1 β), incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), (Ballabh et al., 2004). Este proceso es fundamental para establecer los límites en las áreas dañadas y poder así recuperar la actividad neuronal por medio de la eliminación de cuerpos apoptóticos y tóxicos como el Beta-amiloide (A β ₁₋₄₂) en la enfermedad de Alzheimer (Gasque et al., 2000; Barnum, 2002; Nguyen et al.,

2002; Wyss-Coray and Mucke, 2002). Además, en procesos patológicos los astrocitos pueden segregar interleucitocinas que regulan la función de las células inmunitarias (Th1 y linfocitos T helper 1) que invaden al SNC, dando lugar a un proceso llamado “*gliosis reactiva*” o “*astrogliosis*”. Para identificar inmunohistoquímicamente los astrocitos existe una proteína marcadora, distintiva e única en este tipo celular, que es la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (Fig. 16) que se detecta aumentada en muchos procesos patológicos (Eddleston & Mucke, 1993; Giaume, 2017; Haines, 2015).

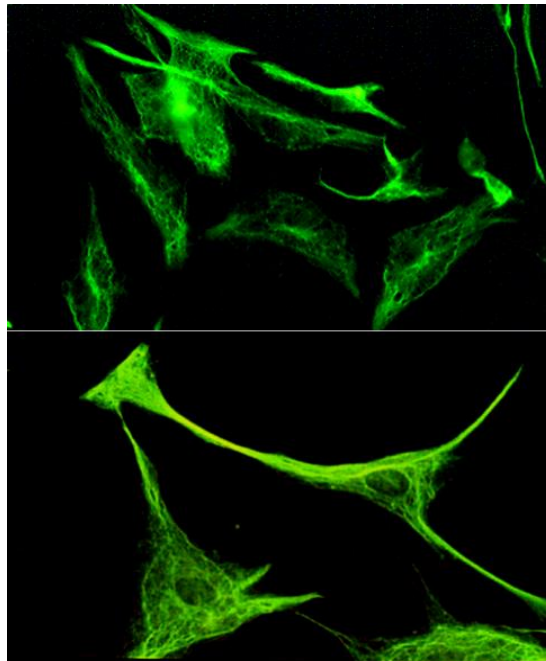


Figura 16: Astrocitos. Inmunofluorescias GFAP + FITC (verde)

Fuente: Adrián Jordá (Laboratorio Dra. Vallés)

En el cerebro adulto los astrocitos conservan la capacidad de proliferación, siendo sensibles a los acontecimientos que alteran el control de la división celular. De esta manera se explica por qué la mayoría de los tumores del SNC son de origen astrocítico, astrocitoma y glioblastomas (Haines, 2015).

Los primeros hallazgos realizados por Altman y Das en la década de 1970 (Das and Altman, 1970) indicaron la formación de nuevas neuronas (neurogénesis) (Magavi et al., 2000) y fue cuando se cuantificó la incorporación de la timidina tritiada en el hipocampo, en dos regiones específicas; la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado (Bernabeu-Zornoza et al., 2018; Gould et al., 1992; Sanai et al., 2004).

Las células pluripotenciales, los astrocitos y las células endoteliales son componentes del nicho celular, un microambiente especializado que interviene en la regulación de la neurogénesis (Horner et al., 2000; Bernabeu-Zornoza et al., 2018) (Fig. 17). Los astrocitos modulan la proliferación de las células pluripotenciales y la migración de estas células a través de la acción de diversos factores de crecimiento o neurotrofinas (neurotróficos) siendo su función impedir que las neuronas inicien la muerte celular programada por apoptosis, como

describió Levi-Montalcini en 1951 (Levi-montalcini and Hamburger, 1951).

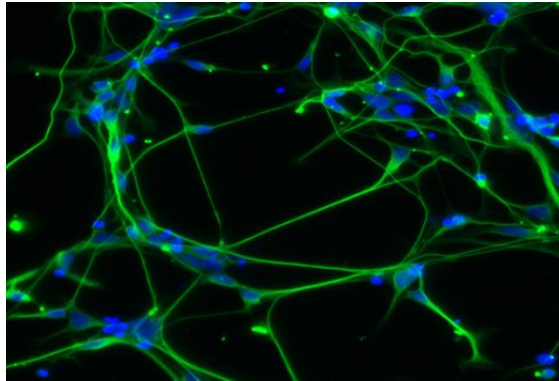


Figura 17: Astrocitos. GFAP (verde) + Hoechst 33342 (azul)

Fuente: Adrián Jordá (Laboratorio Dra. Vallés)

Las neurotrofinas que provocarán las cascadas de señalización de crecimiento y diferenciación se unirán a dos tipos de receptores: las tirosina quinasas, los TrK (tropomyosin-related kinase, Trk_A, Trk_B, Trk_C) y al receptor p75NTR (receptor de citocinas) relacionado con el TNF- α (Lorigados-Pedre and Bergado-Rosado, 2004). Las neurotrofinas más destacadas son: el factor de crecimiento neural (NGF, nerve growth factor), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) (Yang et al., 2008b) estimulador de la neurogénesis con una función importante en el desarrollo neurológico normal, las neurotrofinas (NT₃, NT₄, NT₅) y

específicamente el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor) (Song et al., 2002) que participan ayudando a estimular y controlar la neurogénesis debido a sus propiedades de neuroprotección (Haines, 2015; Bernabeu-Zornoza et al. 2018). Por otra parte, se ha demostrado la existencia de astrocitos, GFAP positivos, (Del Moral, 1993; Zonta et al., 2003) con características de células madre que pueden generar precursores neuronales (Azizi and Krynska., 2013; Palmer et al., 1997).

Los astrocitos intervienen en la protección cerebral mediante la inducción de la inflamación (Karve et al., 2016). Cuando este proceso se cronifica, se incrementa la liberación de sustancias pro-inflamatorias por la glía (Marchand et al., 2005; Cuenca-López et al., 2010; Halaris., 2013; Kumar et al., 2013; Ramesh et al., 2013). En este caso las neuronas activas tienen un efecto supresor sobre la activación de la glía, previniendo y limitando el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Tsacopoulos y Magistretti., 1996; Fields y Stevens-Graham., 2002; Nedergaard et al., 2002; Auld y Robitaille., 2003; Newman., 2003; Zonta et al., 2003).

En conjunto, todos los estudios apoyan la hipótesis de que los astrocitos, más allá de su papel de soporte a las neuronas,

poseen un papel importante en la regulación de la neurogénesis (Kehl et al., 1997) y de los procesos sinápticos, incluida la transmisión sináptica (Parpura et al., 2012; Dodla et al., 2010; Guillamón-Vivancos et al., 2015; Bernabeu-Zornoza et al. 2018). En enfermedades neurodegenerativas (END), como por ejemplo Alzheimer (EA) o Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), en situaciones de estrés, depresión y falta de sueño, hay evidencias de que la neurogénesis disminuye y de que los factores neurotróficos van a prevenir la atrofia y la muerte neuronal durante el desarrollo y la vida adulta (Bernabeu-Zornoza et al. 2018).

1.4.2.2 OLIGODENDROCITOS

Los oligodendrocitos son las células encargadas de producir y mantener la mielinización axonal en el SNC, similar a las células de Schwann en los nervios periféricos y se reparten tanto por la sustancia gris como por la blanca (Cajal, 1913; del Río-Hortega, 2012; Ndubaku and de Bellard, 2008). Son más pequeños que los astrocitos y sus núcleos son irregulares y densamente teñidos, el citoplasma contiene un extenso aparato de Golgi, muchas mitocondrias y gran número de microtúbulos. En la sustancia gris se sitúan junto a los somas neuronales y los rodean, extendiéndose desde el

segmento inicial del axón hasta la rama terminal. En la sustancia blanca la vaina rodea a algunos axones para aislarlos electroquímicamente (Fig.18). Esta vaina no es continua a lo largo de toda su longitud y sus interrupciones se denominan “*nódulos de Ranvier*”.

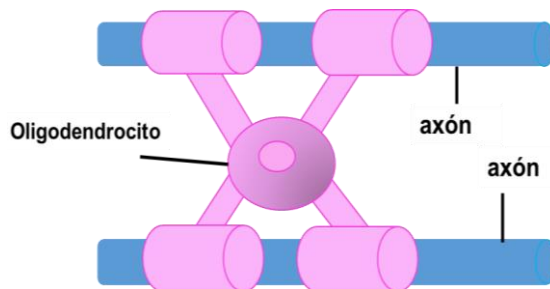


Figura 18: Oligodendrocito

Fuente: Adrián Jordá

Los segmentos entre los nódulos adyacentes se llaman “*segmentos internodulares o internódulos*”. La vaina de mielina produce un aumento de velocidad de conducción de los potenciales de acción en la transmisión nerviosa. La pérdida de mielina ocasiona la disminución de la velocidad de conducción y de propagación del potencial de acción en estos axones (Haines, 2015). Expresan receptores de glutamato y presentan baja resistencia a procesos de estrés oxidativo, lo cual les hace más susceptibles a procesos de apoptosis y necrosis (Matute

et al., 2007). Los axones desmielinizados sobreviven algún tiempo, y es posible que se produzca un grado de remielinización gracias al crecimiento de células precursoras de oligodendrocitos, la liberación de factores tróficos para neuronas y astrocitos (Barres et al., 1992; Gard et al., 1995; Fernández et al., 2000; Haines, 2015). El daño de estas células conlleva a la lesión o muerte en enfermedades con pérdidas de mielina y neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer o ELA (McDonald et al., 2001; Compston and Coles, 2008; Losy, 2013).

1.4.2.3 MICROGLÍA

Los microgliocitos son las células inmunitarias efectoras o macrófagos del SNC (Fig. 19) (Gehrmann et al., 1995; Rock et al., 2004). Al igual que los macrófagos, las células microgliales tienen la capacidad de convertirse en fagocitos y ante una lesión son activados emigrando a la zona dañada donde proliferan y fagocitan los residuos celulares (del Río-Hortega, 2012; Davoust et al., 2008; Haines, 2015). En estudios in vitro e in vivo, se ha detectado un aumento en los canales de sodio dependientes de voltaje en la espina dorsal después del daño, produciendo activación de la microglia e incrementando posteriormente la respuesta inflamatoria (Jung et al., 2013; Cummins et al., 2007).

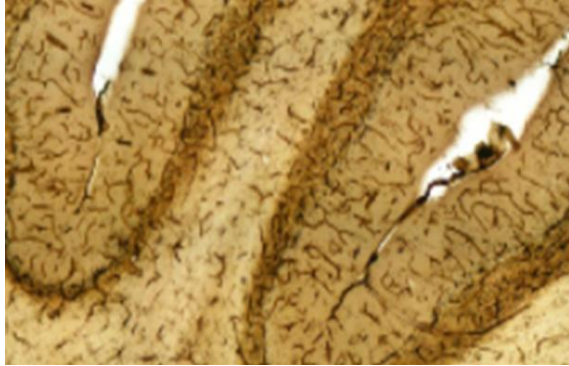


Figura 19: Microglía de cerebelo teñida NADPasa

Fuente:

www.wesapiens.org/es/file/14893002/Microglia%2C+T%C3%A9cnica+de+la+NADPasa

Las principales citocinas que actúan en respuesta a la inflamación, como son la citocina IL1- β , el factor de necrosis tumoral (TNF- α), otras citocinas y las prostaglandinas también son segregadas por los microgliocitos activos (Fig. 20) (Van Veen and Chang, 1997). La glutamina obtenida por la neurona es liberada en forma de glutamato al medio extracelular. Los astrocitos son los encargados de captarlo y permitir el paso de glutamato a glutamina para poder ser utilizado por las neuronas. Los astrocitos también se encargan de producir la secreción de IL-6 y otros mediadores inflamatorios. Algunas de las moléculas liberadas son neurotóxicas (glutamato y radicales de oxígeno).

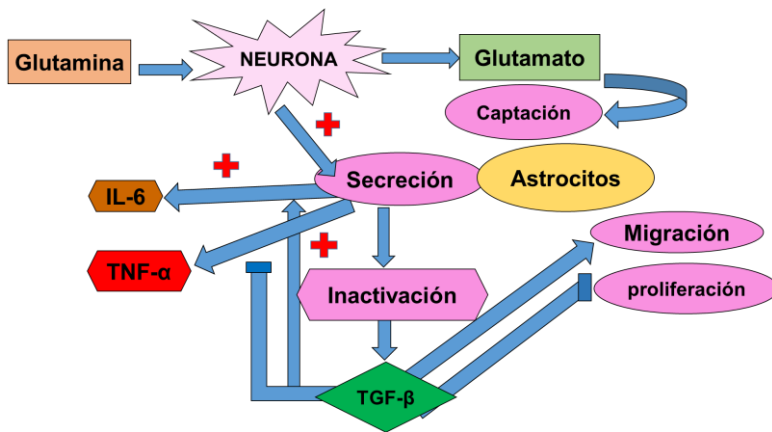


Figura 20: Citoquinas involucradas en la respuesta de inflamación

Fuente: Adrián Jordá.

La excesiva secreción de mediadores pro-inflamatorios como son IL-1 β y TNF- α induce a las células endoteliales a abrir la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo así la inflamación leucocítica del parénquima cerebral, como ocurre en la meningitis bacteriana (Haines, 2015).

Las diferentes células cerebrales son importantes en mayor o menor medida en la funcionalidad de SNC y su interrelación es necesaria y ocurre tanto en situaciones fisiológicas como conforme la edad avanza. En la tabla 2, se indican las principales células gliales del SNC y sus principales funciones. Gracias a las células de apoyo de las neuronas, la función cerebral se lleva a cabo de manera óptima.

TIPO DE CÉLULA	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
ASTROCITOS	Todo SNC, en contacto con somas, dendritas y axones. Alrededor de los vasos sanguíneos.	Mantener entorno iónico extracelular, apoyo estructural y metabólico a neuronas, intervención en memoria y aprendizaje.
OLIGODENDROCITOS	Forman vaina de mielina alrededor de los axones y rodean a los somas neuronales.	Mielinización.
MICROGLÍA	Sustancia gris y blanca.	Eliminación y fagocitosis de los residuos después de una lesión y muerte celular. Secreción de citocinas.

Tabla 2: Tipos de células gliales

Fuente: Adrián Jordá

1.5 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

Es una enfermedad neurodegenerativa que se presenta con mayor prevalencia en la población anciana. Afecta a alrededor de 37 millones de personas en todo el mundo y se espera que su avance sea mayor con el paso de los años alcanzando un aumento del 100% en países desarrollados para el año 2040 (Ferri et al., 2005). Otra característica de la

enfermedad es su mayor riesgo en la población femenina sin que se sepan todavía las causas de la diversidad por género (Andersen et al., 1999; Di Carlo et al., 2002; Henderson., 2013). Los primeros síntomas en la EA son la pérdida paulatina de la memoria, desórdenes del lenguaje, cambios de humor y/o comportamiento y desorientación espacio-temporal. Con el deterioro cognitivo y motor, la enfermedad progresa hasta alcanzar la incapacidad total de las funciones corporales (Selkoe, 1997) (Fig. 21).

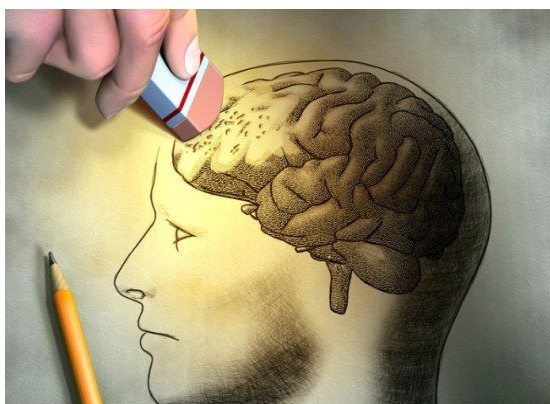


Figura 21: Alzheimer y cerebro

Fuente: [Http://www.linkedin.com/pulse](http://www.linkedin.com/pulse)

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, la EA se caracteriza por la presencia de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en diversas áreas del cerebro, responsables de

la pérdida neuronal, el deterioro de las conexiones sinápticas y la gliosis reactiva causando la inflamación característica de esta enfermedad (Giulian, 1999; Wyss-Coray y Mucke, 2002). Los cambios neuropatológicos se presentan con mayor intensidad en el hipocampo, la corteza entorrinal, la corteza cerebral y estructuras subcorticales (Arnold et al., 1991). En la tabla 3 se indica como es la enfermedad, sus síntomas y a quienes afecta (Tabla 3).

COMO ES LA ENFERMEDAD

El volumen del cerebro se reduce por la muerte de las células nerviosas.

Las hendiduras y surcos se hacen más notorios.

Las células que subsisten pierden capacidad de reaccionar a los estímulos nerviosos.

SINTOMAS

- Breves pérdidas de la memoria.
- Cambios de personalidad (apatía. Desinterés en la actividad social).
- Erráticos cambios de humor.
- Irritabilidad y dificultades motrices.
- Confusión, desorientación temporal.

A QUIENES AFECTA

- 20% De los mayores de 70 años.
- Rara vez aparece antes de los 40 años.

Tabla 3: Enfermedad de Alzheimer

Fuente: Adrián Jordá Vallés

La aparición de la EA puede ser de comienzo temprano o tardío. En el primer caso, también denominado Alzheimer familiar, aparece con anterioridad a los 65 años, tiene una prevalencia baja, tan solo del 5% y se relaciona con el patrón de herencia autosómico dominante. La variante de la EA tardía está relacionada con el envejecimiento y factores de riesgo como obesidad, diabetes, medio ambiente y alimentación (Munoz y Feldman, 2000; Nussbaum y Ellis, 2003; Lindsay et al., 2002; Blennow et al., 2006; Withers et al., 1998). Aparece con posterioridad a los 65 años y presenta una prevalencia mayor. Independientemente de su origen, ambas variantes producen cambios en la actividad de presenilina 1 (PSEN₁) (Sherrington et al., 1995), presenilina 2 (PSEN₂) (Levy-Lahad et al., 1995) y de la proteína precursora del amiloide (APP) (Goate y et al., 1991; Mullan et al., 1992). Además, los enfermos de Alzheimer familiar presentan polimorfismos específicos de la apolipoproteína E (Williamson et al., 2009). Como resultado de estas mutaciones, se producen cambios en el metabolismo celular que conducen al mal procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) (Bailey et al., 2011) y como consecuencia se produce un aumento de la producción del péptido amiloide A β ₁₋₄₂, y A β ₁₋₄₀, precursores de las placas neuríticas presentes en la enfermedad de Alzheimer (Scheuner et al., 1996).

1.5.1 EL PÉPTIDO A β Y SU SÍNTESIS

Se distinguen tres tipos principales de placas seniles, las placas difusas que son depósitos de amiloide no fibrilar que no alteran el neuropilo (constituye la región entre los somas neuronales) ni inducen una respuesta glial, por lo que no suelen acarrear un deterioro cognitivo; las placas amiloideas con un centro más o menos denso y las placas compactas o neuríticas de naturaleza tóxica y específica de la enfermedad de Alzheimer. Esta última conteniendo placas neuríticas, astrocitos y microglía activada (Cacabelos, 1999). No fue hasta mediados de los 80 cuando se publicó la naturaleza química de estas placas, constituidas fundamentalmente por un péptido de 1-40 a 1-42 aminoácidos el cual se denominó inicialmente A4 y posteriormente péptido β -amiloide (A β). El péptido posee un peso molecular de 4 kDa y una secuencia proteica primaria de 42-43 aminoácidos que sigue la ruta secretora en su formación (retículo endoplasmático, aparato de Golgi y endosomas), o que se puede introducir en las células a través de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad. Existen dos especies diferentes de este péptido, el A β ₁₋₄₀ y el A β ₁₋₄₂, que se producen como producto resultante del catabolismo de la APP a cargo de las enzimas β y γ -secretasas. De las dos formas de A β , el más tóxico es el A β ₁₋₄₂ que forma agregados y placas con mayor facilidad que el A β ₁₋₄₀.

El A β tiene su origen en la proteólisis secuencial de la APP (Iida et al., 2002; Kang et al., 1987) por el complejo enzimático de las α -, β - y γ - secretasas (Fig. 22). La α -secretetasa pertenece a la familia de proteínas adamalislina o ADAMs (desintegrinas y metaloproteinasas) que incluyen entre otras la convertasa del factor α de necrosis tumoral (Asai et al., 2003). La β -secretetasa es una aspartil proteasa asociada a membrana, que actúa en el sitio β de la proteína APP (Farzan et al., 2000; Vassar, 2004). La γ -secretetasa posee actividad catalítica modulada por los genes PSEN 1 y PSEN 2 (Kimberly et al., 2003) (Fig. 22).

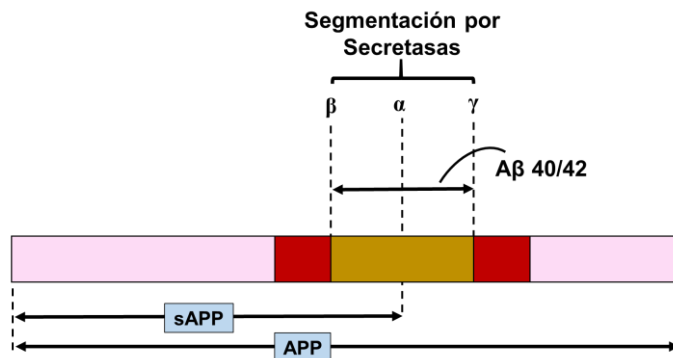


Figura 22: Estructura de la proteína APP

Fuente: Adrián Jordá Vallés

Una vez se ha sintetizado en el retículo endoplasmático rugoso, la APP pasa al aparato de Golgi, se glicosila y se

empaqueta en vesículas de transporte atravesando el citoplasma para finalmente insertarse en la membrana celular y ser procesada por acción del complejo enzimático α -, β - y γ -secretasas, siguiendo dos rutas (LaFerla et al., 2007).

La primera ruta, denominada no amiloidogénica, es la ruta predominante del procesamiento de APP y excluye la generación del péptido β -amiloide (Selkoe, 1991). Durante esta ruta la α -secretasa realiza un corte en la proteína APP entre los aminoácidos 687 y 688 correspondientes a los residuos 16 y 17 del péptido A β , generando la secreción del dominio N-terminal, que es una forma truncada de la proteína APP, denominada APP soluble α (sAPP α) (Allinson et al., 2003) que está implicada en la sinaptogénesis (Morimoto et al., 1998) y tiene además una gran importancia en la formación y consolidación de la memoria (Huber et al., 1993; Meziane et al., 1998) así como en el almacenamiento de la misma (Roch et al., 1994). Por otro lado, el fragmento C-terminal resultante de 83 aminoácidos, denominado C83 ó α -CTF, permanece anclado en la membrana para, seguidamente, ser procesado por la enzima γ - secretasa, cortando entre los aminoácidos 712, 714 ó 715, correspondientes a los residuos 40, 42 ó 43 del péptido A β , generando un pequeño péptido denominado p3 (Haass et al., 1993) y un fragmento intracelular de APP denominado AICD (APP Intracellular Cytoplasmic Domain) ó γ -CTF (Haass

et al., 1993). En esta ruta, la acción de la α -secretasa previene la formación del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$, con lo que se impide la formación de depósitos. La segunda ruta es la amiloidogénica, durante la cual se genera el péptido $A\beta$ y de nuevo necesita la acción secuencial de dos proteasas (Haass, 2004). El primer corte es debido a la β -secretasa en el extremo N-terminal de la secuencia del péptido $A\beta$, entre los aminoácidos 671 y 672, promoviendo la liberación del fragmento APP soluble β (sAPP β) y la generación de un fragmento C-terminal, anclado en la membrana, de 99 aminoácidos denominado C99 ó β -CTF (Vassar, 2001). Por último, el procesamiento de C99 por el complejo γ -secretasa da lugar al péptido $A\beta$ y al fragmento γ -CTF (Gandy, 2005). Esta ruta amiloidogénica genera principalmente una especie de 40 aminoácidos denominado $A\beta_{40}$ y una especie de 42 aminoácidos denominado $A\beta_{42}$. De estas, aproximadamente el 90% corresponde a la $A\beta_{40}$ y, a pesar de que ambas especies son neurotóxicas e insolubles, el péptido $A\beta_{42}$ se agrega con mayor facilidad y, por lo tanto, es más proclive a la formación de las placas amiloides (Iwatsubo et al., 1994). En condiciones normales los dos péptidos tóxicos se producen en muy bajos niveles. Se diferencian en dos aminoácidos pero, aún así, tienen propiedades fisicoquímicas muy diferentes. $A\beta_{1-42}$ tiene tendencia a polimerizar formando oligómeros solubles que se agregan en protofibrillas, que le llevan a conformar la estructura

terciaria de la hoja β plegada característica de todos los péptidos amiloides. La concentración de este péptido está estrechamente regulada, formando un equilibrio entre su génesis y eliminación realizada por parte de enzimas degradadoras como la neprilisina, la enzima degradadora de insulina (EDI) y la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA1) (Cacabelos, 1999). Estas placas, que se pueden observar en pacientes con la EA, están implicadas en desencadenar una cascada de procesos que conducen a la muerte neuronal masiva (Giulian, 1999) (Fig. 23).

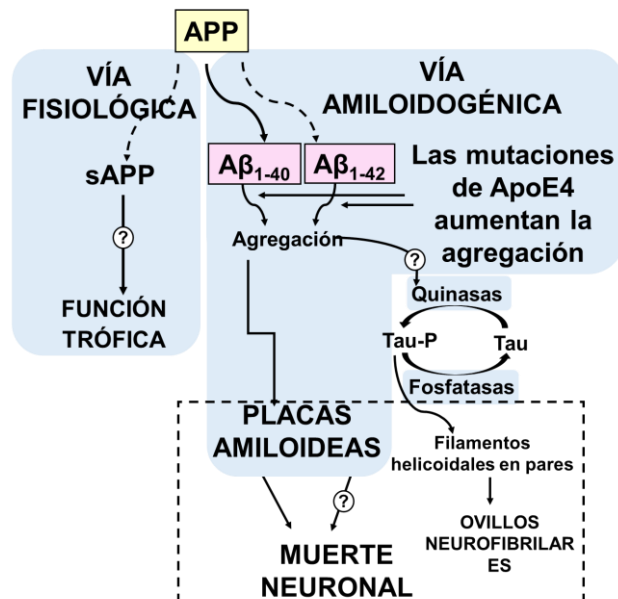


Figura 23: Procesamiento de la proteína APP

Fuente: Adrián Jordá Vallés

1.5.2 ACTIVIDAD NO PATOLÓGICA DEL β AMILOIDE

Son funciones no asociadas con la enfermedad de Alzheimer que incluyen la activación de quinasas (Bogoyevitch et al., 2004; Tabaton et al., 2010), protección contra estrés oxidativo (Zou et al., 2002; Baruch-Suchodolsky and Fischer, 2009), la regulación del transporte de colesterol (Yao and Papadopoulos, 2002; Igbavboa et al., 2009), actuando como un factor de transcripción (Maloney and Lahiri, 2011) y actividad antimicrobiana especialmente asociado con su acción pro-inflamatoria (Soscia et al., 2010).

1.5.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA β AMILOIDE

La proteína Beta-amiloide está no estructurada, por lo que en solución no adquiere una conformación terciaria compacta sino que forma un conjunto de estructuras. Por esa causa, no puede ser cristalizada y casi todo lo que se conoce de ella proviene de los estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y de dinámica molecular. Los modelos derivados de la RMN indican que es un polipéptido de 26 aminoácidos formado a partir de beta-amiloide, $A\beta$ 10-35 que muestran una estructura en espiral sin una estructura secundaria significativa, (Zhang et al., 2000). También se ha demostrado, mediante

estudios de réplica, cambio y dinámica molecular, que la proteína β amiloide se puede encontrar en diversos estados (Yang and Teplow, 2008a). Además, en simulaciones guiadas por RMN, parece que la proteína β amiloide 1-40 y beta-amiloide 1-42 cuentan con estados de conformación muy diferentes (Sgourakis et al., 2007) con el fragmento C-terminal de la β amiloide 1-42 siendo más estructurado que el de los fragmentos de la 1-40.

Respecto al estado oligomérico, la información estructural es aún escasa ya desde el año 2010. Cuando las condiciones son de baja temperatura y baja sal se logra aislar los oligómeros en pentaméricos en forma de disco de esta proteína, y Ahmed y colaboradores vieron que son carentes de estructura beta (Ahmed et al., 2010). Por otra parte, oligómeros solubles preparados en presencia de detergentes parecen tener un contenido importante de láminas beta con caracteres paralelos y antiparalelos, diferentes de fibrillas (Yu et al., 2009).

1.5.4 ESTRATEGIAS CONTRA EL AMILOIDE

Las estrategias de intervención que los investigadores indican como las más plausibles son (Citron, 1992):

- **Inhibidores de β -secretasa:** Impiden la primera división de APP fuera de la célula.
- **Inhibidores de γ -secretasa (semagacestat):** Actúan bloqueando la segunda división de APP en la membrana celular y por lo tanto, detienen la subsecuente formación de $A\beta$ y sus fragmentos tóxicos.
- **Agentes reductores selectivos de $A\beta$ -42 (por ejemplo, tarenflurbil):** Modulan la γ -secretasa para reducir la producción de $A\beta_{1-42}$ favoreciendo otras versiones de $A\beta$ (fragmentos más cortos).
- **Inmunoterapias:** Estimulan el sistema inmune para reconocer y atacar al $A\beta$, proporcionar anticuerpos que previenen la deposición de la placa, o mejorar la eliminación de las placas.
- **Agentes anti-agregantes (Lashuel et al., 2002) (apomorfina):** Evita que los fragmentos del $A\beta$ se acumulen o que se eliminen si es que ya se agregaron (Hanaki et al., 2018).

Además, se ha descrito que suplementos de la hormona melatonina podrían ser eficaces contra la proteína β amiloide. La melatonina interactúa con la proteína β amiloide e inhibe su agregación (Pappolla et al., 1998; Lahiri et al., 2005; Wan et al., 2008). Esto se produce sólo a través de una interacción con los dímeros del péptido β amiloide soluble y además, la melatonina

no revierte la formación de fibrillas u oligómeros de β amiloide una vez que se forman. Han sido experimentos en ratones transgénicos los que han sugerido que la melatonina tiene el potencial de prevenir la deposición de amiloide si se administra de forma temprana, pero no es eficaz para revertir la deposición de amiloide una vez que se deposita, para tratar la enfermedad de Alzheimer. La relación de Alzheimer con la melatonina, derivada de la serotonina, que también regula el sueño, se ve reforzada por las investigaciones recientes que muestran que en el estado de vigilia, donde se induce la hormona orexina, se produce una clara influencia sobre el péptido β amiloide (Kang et al., 2009). Por otra parte, los experimentos con animales han mostrado que la melatonina también puede corregir ligeras elevaciones de colesterol, que es también un factor de riesgo temprano para la formación de placas de amiloide. Curiosamente, el cannabinoide HU-210 previene la inflamación promovida por β amiloide (Kang et al., 2009), al igual que el cannabinoide Win (Aguirre-Rueda et al., 2015a).

1.5.5 RITMOS CIRCADIANOS Y ALZHEIMER

En el año 2009 se publicó un artículo donde se demostraba que la producción del β amiloide tiene un ciclo circadiano, aumenta cuando la persona se encuentra en estado

de vigilia y disminuye durante el sueño (Kang et al., 2009). La producción del neuropéptido orexina, durante el estado de vigilia, es necesaria para la producción del ritmo circadiano de la β amiloide. El artículo demuestra que largos períodos de vigilia (debido a la falta de sueño) puede ocasionar una acumulación crónica de β amiloide, que podría hipotéticamente conducir a la enfermedad de Alzheimer (Kang et al., 2009) (Fig. 24). Los recientes descubrimientos en los cuales la privación crónica o excesiva de sueño está asociada con el inicio de Alzheimer, concuerdan con los hallazgos de Kang y sus colaboradores.

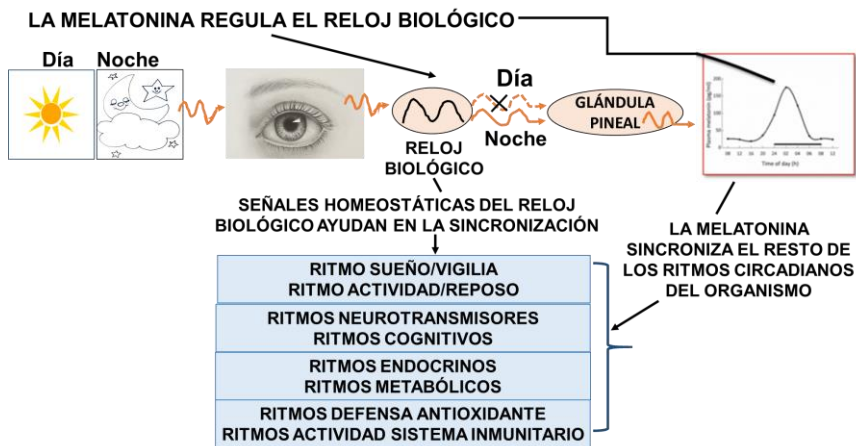


Figura 24: Ciclo circadiano

Fuente: Adrián Jordá

La melatonina también se encuentra relacionada con el mantenimiento del ritmo circadiano y de manera particular también se ha relacionado con el fenómeno "crepuscular", en el cual los pacientes con enfermedad de Alzheimer que tienen las placas amiloides en el hipotálamo, muestran exacerbación de los síntomas de la enfermedad al finalizar el día. Este fenómeno "crepuscular" puede estar directa o indirectamente relacionado con el descubrimiento reciente sobre el aumento continuo en la producción del β amiloide durante el transcurso del día (Fig. 24).

1.5.6 MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA β AMILOIDE

Diferentes formas de medición del β amiloide:

- Puede ser medido de manera semi-cuantitativa por medio de inmunomarcación permitiendo determinar también su ubicación. β amiloide puede ser principalmente vascular, como en la angiopatía amiloide cerebral, o situarse en las placas seniles y vasculares.
- La prueba de ELISA es un método altamente sensible consistente en un inmunoensayo útil para detectar β amiloide con ayuda de dos anticuerpos específicos que funcionan como marcadores.

- Compuestos por imágenes, en particular el Compuesto Pittsburgh-B, (BTA-1, un thioflavin), que de forma selectiva pueden unirse a β amiloide in vitro e in vivo. Esta técnica se utiliza de manera muy efectiva combinada con imágenes de PET y ha sido utilizada para áreas de imagen de los depósitos de placa en los pacientes con Alzheimer.
- Microscopía de fuerza atómica que puede visualizar superficies moleculares a escala nanométrica. Se puede utilizar para determinar el estado de agregación del β amiloide in vitro (Rekas et al., 2007).
- Interferometría de polarización dual, es una técnica óptica que puede medir las primeras etapas de agregación y la inhibición mediante la medición del tamaño molecular y la densidad de las fibras alargadas (Gengler et al., 2007; Sanghera et al., 2009).

1.5.7 TEORIAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Existen diferentes teorías sobre la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. La tabla 4 expone las teorías que se han propuesto a lo largo de la existencia de esta enfermedad.

TEORIAS ALZHEIMER	Péptido β amiloide	Proteína TAU	Mutación Genes cromosomas 17 y 21	Teoría Vascular
	Aparición Péptido β Amiloide	Hiper- fosforilación Proteína TAU Intraneuronal	Gen 17- proteína TAU Gen 21- proteína β Amiloide	Hipo- perfusión Cerebral

Tabla 4: Teorías enfermedad de Alzheimer

1.5.7.1 TEORÍA DEL PÉPTIDO β AMILOIDE

Se relaciona con la proteína beta amiloide ya que la producción del péptido β amiloide en cantidades mayores a las normales se piensa que tiene una clara influencia en el origen de la enfermedad. Esta teoría también ha sido llamada “la hipótesis de la cascada amiloide” (Hardy and Higgins, 1992). Los ovillos neurofibrilares aparecerían como consecuencia al daño ocasionado por el péptido tóxico a las neuronas. Se sabe, por numerosos estudios en cultivo primario (Vallés et al., 2010; Aguirre-Rueda et al., 2015b), que el péptido tóxico β amiloide, no la forma monomérica o soluble del péptido sino la forma oligomérica, es tóxica para las neuronas, al tiempo que ejerce efectos tróficos sobre las células gliales. Además, desencadena la respuesta inflamatoria y no que son sub-

productos de esta. Pero la liberación de citoquinas en las fases iniciales de la inflamación conduce a una mayor acumulación del péptido tóxico, con lo que el problema se exagera cada vez más (Tuppo and Arias, 2005). Durante estos últimos años se ha observado que, tanto in situ como in vitro, el péptido tóxico β amiloide desencadena la reacción inflamatoria en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, detectándose diferentes marcadores inflamatorios expresados de manera desproporcionada en la enfermedad (Walsh and Selkoe, 2007).

1.5.7.2 TEORÍA DE LA PROTEÍNA TAU

Esta teoría defiende que es la hiperfosforilación de la proteína Tau la involucrada en la formación de los daños neuronales. Esta proteína aparece en los ovillos de degeneración neurofibrilar, que constituyen una de las características histológicas de la enfermedad. Se encuentran en el citoplasma de las neuronas y su número está directamente relacionado con la severidad de la demencia. Están formados por multitud de filamentos helicoidales emparejados con características diferentes de los neurofilamentos y microtúbulos considerados normales. La proteína Tau es una de las proteínas fundamentales que se

encuentra anormalmente fosforilada en los microtúbulos de la enfermedad de Alzheimer (Boutajangout and Wisniewski, 2014).

1.5.7.3 MUTACIONES GENES CROMOSOMAS 17 Y 21

Las mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloidea son responsables del 5 a 20% de los casos de enfermedad de Alzheimer familiar precoz. La proteína precursora amiloidea se encuentra localizada en el cromosoma 21. Esta proteína, al ser procesada por una vía amiloidogénica, origina el β amiloide que se deposita en las placas seniles y causa efectos tóxicos directos sobre las neuronas. En el cromosoma 17 se encuentra el gen que codifica la síntesis de la proteína Tau. Las mutaciones de este gen provocan una fosforilación irreversible de la proteína que ocasionará una función anormal y favorecerá su autoagregación formando los ovillos neurofibrilares. La correlación entre lesiones patológicas y la intensidad de la enfermedad ha sido únicamente establecida con los ovillos neurofibrilares, por lo que muchos autores creen que esta teoría debería ser la más plausible. De todas maneras, la mayoría de los autores sigue pensando que es la teoría amiloidogénica la más plausible. El desequilibrio entre la formación y la eliminación de $A\beta$ y su posterior

acumulación sería el desencadenante de una serie de eventos negativos como la disfunción sináptica, la inflamación glial, la hiperfosforilación y la agregación de TAU en ovillos neurofibrilares. Todos estos desembocarían en la muerte neuronal. La principal novedad de esta hipótesis radicó en conferir a la A β un papel causal y muy importante sobre la vía de la proteína TAU, que sería un evento de naturaleza secundaria (Murray et al., 2009).

1.5.7.4 TEORÍA VASCULAR

La teoría vascular de la enfermedad de Alzheimer fue propuesta hace ya 24 años por unas observaciones realizadas en ratas envejecidas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica (De Jong et al., 1997). En los últimos años esta teoría se está convirtiendo, poco a poco, en la más aceptada. Se la considera la piedra angular de numerosos estudios de neuroimagen donde se analizan los cambios hemodinámicos cerebrales y en particular la hipoperfusión que aparece en pacientes mayores con riesgo importante de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

La mayoría de los neuroradiólogos, indican que la hipoperfusión cerebral se relaciona con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y que la alteración del riego sanguíneo cerebral puede servir como marcador biológico clave para poder predecir la progresión del defecto cognitivo leve detectado en los estadios tempranos de la enfermedad.

Actualmente, el uso como predictor pre-clínico de la hipoperfusión cerebral se ha convertido en decisivo para clasificar los pacientes de alto o bajo riesgo de desarrollar deterioro cognitivo y también para evaluar cómo de efectivas son las intervenciones terapéuticas. La investigación que los grupos de neuroimagen realizan en nuestros días pretende conseguir nuevas perspectivas para ampliar la comprensión de la enfermedad de Alzheimer y mejoramiento del estilo de vida de los enfermos. Los métodos de neuroimagen se están utilizando para monitorizar la actividad cerebral normal y cognitiva dañada. Algunas técnicas son muy potentes; diagnostican, cuantifican, pronostican y predicen el deterioro cognitivo bastante antes de sufrir la enfermedad de Alzheimer, incluso en un estado de salud cognitiva adecuada. Además, las imágenes multimodales nos ofrecen nuevas ideas para el tratamiento y prevención del deterioro cognitivo leve en avanzada edad y un mejor entendimiento de la organización

funcional y estructural del cerebro humano (Armstrong, 2013; Rentoumi et al., 2014).

1.6 MUERTE CELULAR: NECROSIS Y APOPTOSIS

La apoptosis y la necrosis (Virchow, 1858) son dos mecanismos mediante los cuales puede ocurrir la muerte celular.

1.6.1 NECROSIS

El término necrosis implica la ruptura de la membrana e hipoxia, lo que produce una disminución de las concentraciones del ATP, liberación de enzimas lisosomales, colapso metabólico, edematización y disolución de la célula, provocando un proceso inflamatorio (Becerra et., 2009) (Fig. 25). En cambio, la apoptosis no origina un proceso inflamatorio ya que la célula se dirige a muerte celular sin ruptura de la membrana celular (Fig. 26) (Xing et al., 2009).

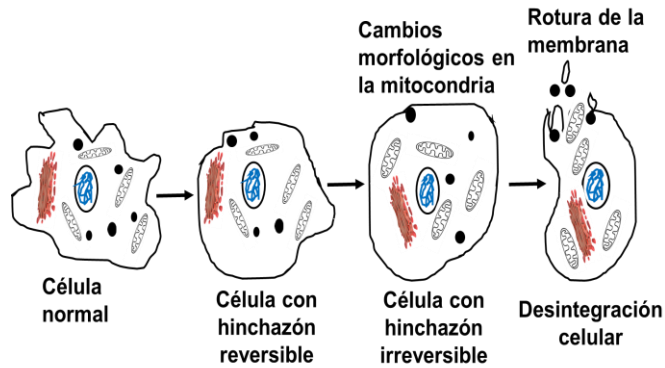


Figura 25: Muerte celular por necrosis

Fuente: Adrián Jordá

1.6.2 APOPTOSIS

La primera descripción del fenómeno de la apoptosis la realizó William Councilman en 1890. En 1914 Robert Schröder describe la presencia de partículas con la cromatina condensada “*picnótica*” en las glándulas endometriales (necrosis por encogimiento) y fue en 1972 cuando se empezó a utilizar el término apoptosis.

La apoptosis, o muerte celular programada, afecta a células individuales más que a todas las células de un tejido y constituye una medida fisiológica de renovación celular. Estando bajo control genético, se caracteriza por el colapso celular, condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Fig. 26).

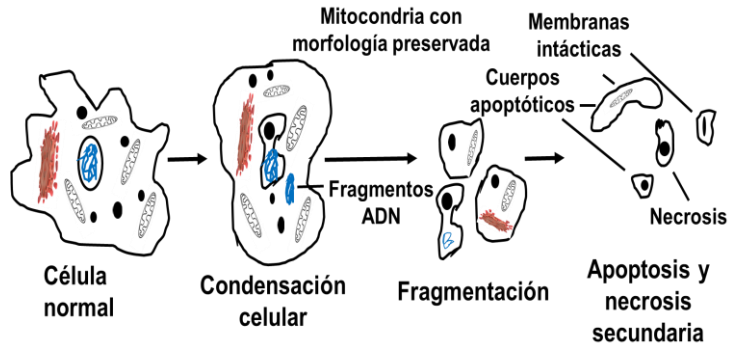


Figura 26: Muerte por apoptosis

Fuente: Adrián Jordá.

Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por macrófagos, evitando así una reacción inflamatoria por secreción de citocinas y por lo tanto, manteniendo la homeostasis tisular que asegura el estado de salud del organismo. En el sistema nervioso del adulto puede ser inducida por diversos factores externos como isquemia, trauma, infecciones y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Lateral Amiotrófica. Además, son fundamentales en las interacciones entre las células del sistema vascular, glial y neuronal (Becerra et al., 2009; Ortega-Camarillo et al., 2001) (Fig. 27).

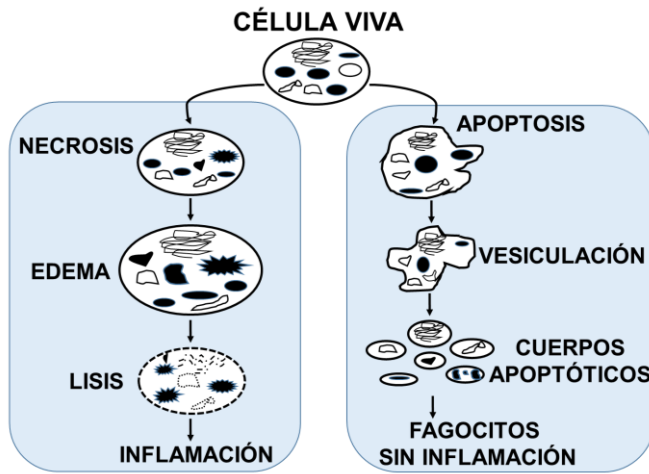


Figura 27: Muerte celular por necrosis y por apoptosis

Fuente: Adrián Jordá.

1.6.2.1 ETAPAS DE LA APOPTOSIS

El proceso apoptótico se diferencia en 3 etapas: la primera fase de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; la segunda fase de ejecución, donde se producen los cambios morfológicos y bioquímicos característicos y una tercera fase de eliminación de los restos celulares, que son degradados por células fagocíticas (macrófagos). En la apoptosis la comunicación intercelular es esencial para que se lleve a cabo el proceso apoptótico.

1.6.2.1.1 LA FASE DE INICIACIÓN

La apoptosis puede ser desencadenada por diferentes señales intracelulares, como el estrés biológico, que provoca la liberación por parte de la mitocondria del Citocromo c, induciendo la vía intrínseca y otras señales como la inflamación local o generalizada producida por tóxicos, bacterias o virus. Las señales proapoptóticas se desencadenan por la unión de FAS (receptor de muerte) a su ligando (Fig. 28), induciendo la vía extrínseca.

1.6.2.1.2 LA FASE DE EJECUCIÓN

En la célula apoptótica se produce una disminución del citoplasma con disminución del tamaño, condensación y fragmentación de la cromatina alrededor de la envoltura nuclear y la generación de vesículas que contienen parte de la cromatina y de los orgánulos celulares que van a constituir los cuerpos apoptóticos. Por otra parte se producen cambios en la mitocondria, como desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis del ATP, estrés oxidativo, reducción del potencial transmembrana y liberación del Citocromo c al citoplasma.

Los cambios a nivel bioquímico de la señal de apoptosis que recibe la célula van a ser transmitidos a través de las enzimas caspasas. Estas enzimas constituyen una familia de proteasas de cisteína que muestran entre si semejanzas en la secuencia de aminoácidos, en la estructura y en la especificidad. Son sintetizadas como pro-enzimas requiriendo un proceso proteolítico para su activación (hidrólisis del polipéptido inactivador de caspasas). Actualmente se conocen 14 caspasas, de las cuales 6 están relacionadas con procesos inflamatorios y las restantes con apoptosis, dividiéndose en caspasas iniciadoras (8, 9 y 12) y ejecutoras (2, 3 y 6) (Casanova, 2003).

Como se ha indicado, hay dos vías que llevan hacia la apoptosis, que son la vía extrínseca o mediada por receptor y la vía intrínseca o mitocondrial. La vía extrínseca se inicia por activación de los receptores de muerte localizados en la membrana celular. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR1, el Fas (Apo-1 o CD95), el DR3 (receptor del muerte 3 o Apo-3), el DR4 (receptor del muerte 4), el DR5 (Apo-2) y el DR6, presentes todos en las células nerviosas (Fig.28).

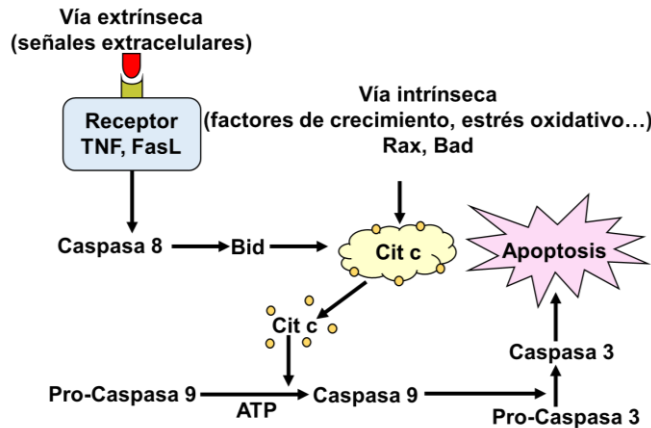


Figura 28: Vías de inducción de la apoptosis

Fuente: Adrián Jordá desde Sabroso, C. M., & Suárez, A. I. T. (2013).

La proteína adaptadora FADD media la inmediata activación de la caspasa 8. Una vez activada desencadena la producción de otras caspasas, incluyendo la 3 y paralelamente puede activar la vía intrínseca por activación de la proteína Bid (Fig. 28), lo cual provoca la salida del Citocromo c (proteína proapoptótica) y del Apaf1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1) de la mitocondria al citoplasma, para formar el apoptosoma y de esta forma activar la caspasa 9 y la vía intrínseca (Angosto, 2012).

Dentro de la mitocondria el Citocromo c, implicado en la fosforilación oxidativa mitocondrial, es uno de los componentes

requeridos para la activación de la caspasa-9 en el citosol. Es importante resaltar que un fallo catastrófico de fosforilación oxidativa provoca neurodegeneración cortico-hipocampal (Sorensen et al., 2001).

El complejo III o complejo Citocromo bc1, obtiene dos electrones y se los transfiere a dos moléculas de Citocromo c. Este último es un transportador de electrones hidrosoluble situado en el espacio intermembrana de la mitocondria (Li, 1997). El complejo IV o Citocromo c oxidasa capta cuatro electrones de las cuatro moléculas de Citocromo c y se transfieren al oxígeno para producir dos moléculas de agua. Además, se translocan cuatro protones al espacio intermembrana, por los cuatro electrones. Por otra parte, cuatro protones formarán el agua al desaparecer de la matriz. En este proceso apoptótico se requiere la presencia de ATP, el cual marca el inicio de la cadena apoptótica a través de la activación de la caspasa-9. Esta funciona como una caspasa iniciadora que a su vez activa las caspasas 3, 6 y 7, caspasas efectoras que inician la vía intrínseca de la apoptosis. En la célula sana la membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 (Fig. 29) que se une a la proteína Apaf-1, ocasionando el mantenimiento de su inactividad (subfamilia I anti-apoptótica).

Ante cualquier alteración del equilibrio interno de la célula y de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, se produce la liberación del Citocromo c al citoplasma, donde su función cambia al interactuar con la proteína Apaf-1 en el dominio WD-40 y con la procaspasa 9 conformando con estas dos proteínas un complejo denominado apoptosoma (Ortega-Camarillo et al., 2001; Hoyos et al., 2015). En el exterior de la mitocondria y con presencia del ATP, el Citocromo c se une a la proteína Apaf-1 formando el complejo denominado apoptosoma que hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3. Esta se encarga de ejecutar la apoptosis, generando distintas proteínas cuya suma resultará en el desmantelamiento ordenado y en la muerte de la célula (Fig. 29).

En última instancia se origina la destrucción de las proteínas estructurales en el citoplasma, se produce la degradación del DNA cromosómico y se inicia la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Hoyos et al., 2015; Angosto, 2012; Ortega-Camarillo et al., 2001; Li, 1997).

La vía intrínseca o mitocondrial (Fig. 29) se inicia por daño en el ADN, por estrés o por otras señales pro-apoptóticas, como la inducción de proteínas Bcl-2 (B-leucemia-celular-2). Este daño produce un aumento de la apoptosis mediante

proteínas activadoras proapoptóticas como Bad, Bax y Bid (subfamilia II y III), que alteran la permeabilidad de la membrana de los orgánulos intracelulares (Li et al., 1998; Wolter et al., 1997; Puthalakath et al., 1999). Cuando estas proteínas se unen a la membrana externa mitocondrial, se forman poros o canales que atraviesan la membrana y alteran la permeabilidad reduciendo el potencial de membrana, aumentando el volumen mitocondrial y permitiendo la salida al citoplasma del Citocromo c (Antonsson & Martinou, 2000).

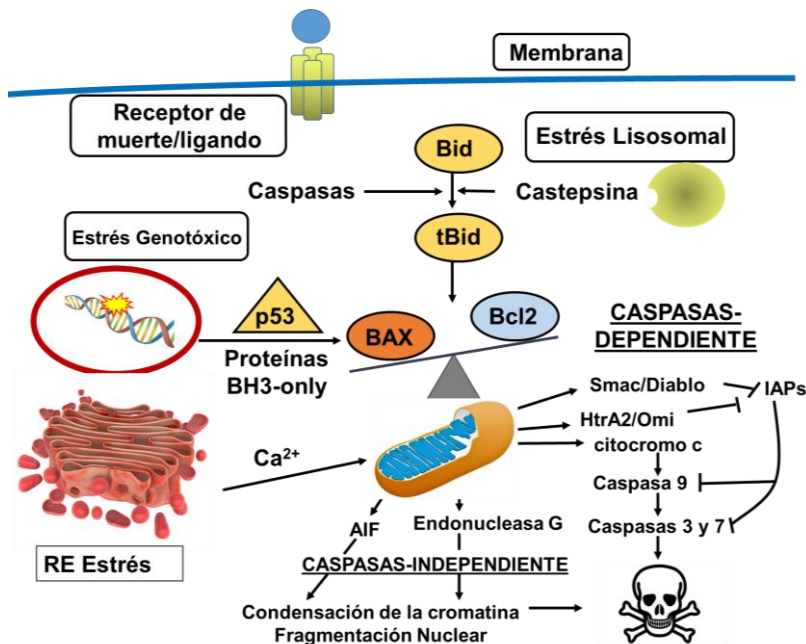


Figura 29: Vías múltiples de estrés celular y apoptosis

Fuente: Adrián Jordá desde Sterin-Speziale & Leocata Nieto, (2007).

Una de las proteínas liberadas por la mitocondria es la AIF (factor inductor de apoptosis). Es una proteína situada en el espacio intermembranal de la mitocondria (Fig. 29). Actúa contra la acción de los radicales libres y participa en reacciones de oxidorreducción al nivel mitocondrial (Becerra et al., 2009). El AIF está localizado en el cromosoma X en los humanos. AIF1 es el más abundante de los tipos de AIF, es trasladado desde el citosol y recolocado en el espacio intermembranal de la mitocondria. Dentro de la mitocondria, AIF pasa a su configuración funcional gracias a la ayuda del cofactor flavin adenin dinucleótido (FAD). AIF funciona como una NADH y NADPH oxidasa, pero actualmente diferentes investigadores han indicado que la zona N-terminal de AIF podría intervenir en las interacciones con otras proteínas o bien controlando las reacciones redox y la especificidad de sustrato (Hangen et al., 2010).

La proteína BAT3, que es utilizada para regular la organogénesis, puede incrementar la vida media de AIF. Como resultado, disminuye la cantidad de BAT3 conduciendo a la fragmentación de AIF. El inhibidor de la apoptosis unido al gen X (XIAP) tiene la capacidad de influenciar, junto a FAD, en la vida media de AIF. Estas dos moléculas no afectan a la unión de AIF a la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, si que

actúan sobre la estabilidad de AIF cuando esta proteína se encuentra en el interior de la mitocondria.

En condiciones de estrés, AIF es liberada desde la mitocondria del mismo modo que el Citocromo c, pero hacia el núcleo celular donde desencadena la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN de la célula, con el fin de inducir la muerte celular programada. Además, la proteína AIF es un efector de muerte independiente de las caspasas, tanto iniciadoras como efectoras, que puede producir cambios en el núcleo para entrar en apoptosis (Becerra et al., 2009; Angosto, 2012).

La proteína Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) o Diablo (direct IAP binding protein with low pI), es la segunda proteína mitocondrial activadora de las caspasas (Adrain et al., 2001). Esta proteína se une directamente a las proteínas inhibidoras de las proteínas apoptóticas (IAP's) antagonizando su función (Fig. 29), permitiendo la producción de la apoptosis por las caspasas iniciadoras, como la 9 y efectoras, como la 3, 6 o 7. De esta forma se asegura que estas proteínas antiapoptóticas no puedan parar la muerte celular programada que la célula ha iniciado (Vucic et al., 2002; Becerra et al., 2009; Angosto, 2012).

Por otra parte, con el fin de conocer los mecanismos “in vivo” para conseguir lograr estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención y evitar la progresión del cáncer, numerosas investigaciones se han dirigido hacia el diseño y desarrollo de moléculas Smac de pequeño tamaño miméticas a esta proteína (Bai et al., 2014; Becerra et al., 2009).

Las rutas iniciadas por el Smac/Diablo, AIF o Citocromo c coexisten en una misma célula y se pueden desencadenar por un mismo estímulo (Becerra et al., 2009). En los últimos años la investigación en enfermedades neurodegenerativas se ha orientado a determinar cuál es la contribución del proceso de apoptosis y a desarrollar las terapias adecuadas para controlar este proceso. Se ha conseguido avanzar tanto a nivel celular en cultivos como en experimentos “in vitro”, donde el conocimiento tanto de los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular programada, como de las vías de señalización implicadas en dichos mecanismos, ha sido y es una prioridad.

1.6.2.1.3 LA FASE DE ELIMINACIÓN

Las células apoptóticas y sus fragmentos experimentan varios cambios en las membranas que inducen a la fagocitosis. Así, son eliminadas antes de sufrir una necrosis secundaria

evitando la inflamación. Numerosos receptores de los fagocitos y ligandos inducidos en las células apoptóticas participan en la unión y en su fagocitosis. Sin embargo, existen claras evidencias de que no son solo los fagocitos los que participan en esta fase de eliminación, sino también las células dendríticas, epiteliales y los fibroblastos (Palmer et al., 1999).

El conocimiento de los mecanismos de la apoptosis (Fig. 30) permite entender el proceso patológico, bien por la inhibición de la apoptosis como en el cáncer (carcinomas con mutaciones de p53, gliomas y cáncer colorrectal), en los tumores dependientes de hormonas (carcinomas, próstata u ovario) y en enfermedades autoinmunes (miastenia gravis) o bien por el incremento del proceso de la apoptosis, como ocurre en diferentes enfermedades neurodegenerativas (EA, p38, Parkinson, ELA y epilepsia), en el daño a los órganos (Diabetes Mellitus 1 o daño isquémico) o en el Sida (Ortega-Camarillo et al., 2001; Vallés et al., 2008). La figura 30 muestra el receptor TNFR1 que a través de TRADD y DED produce apoptosis, pero que puede conectarse también mediante proteínas acopladas a Src e inhibir la apoptosis. Además en esta figura se indican las proteínas implicadas en la apoptosis como: Fas, que son receptores detectados por anticuerpos monoclonales. CD95, que unen a la citoquina Fas-ligand. TNFR-1, que es el factor de necrosis tumoral receptor 1 que se une a la citoquina TNF. DD,

APOPTOSIS

The diagram illustrates the pathways of apoptosis, starting from various stimuli and leading to the execution phase.

VÍA INTÍNSECA (Intrinsic Pathway):

- ESTÍMULOS externos/internos:** External or internal stimuli.
- Memb. mitocondria Bad, bax:** Mitochondrial membrane proteins.
- Citocromo "c":** Cytochrome c.
- Apaf-1~ PROCASPASA 9:** Apaf-1 and procaspase 9.
- Heterodímero libre en citosol:** Free heterodimer in the cytosol.
- ATP:** Adenosine triphosphate.
- CASPASA 9 (I):** Active caspase 9.
- CASPASA 3 (I):** Active caspase 3.
- Granzima B:** Granzyme B.
- PERFORINAS:** Perforins.
- PROCASPASA 3:** Pro-caspase 3.
- CASPASA 3 (E):** Active caspase 3.
- CASPASA 2 (E):** Active caspase 2.
- CASPASA 6 (E):** Active caspase 6.
- ENDONUCLEASA:** Endonuclease.
- DNA Ladder 180 – 200 bp:** DNA ladder.

VÍA EXTRÍNSECA (Extrinsic Pathway):

- SEÑALES EXTRACELULARES:** Extracellular signals.
- LINFOCITOS T CD4 / Células NK:** CD4 T lymphocytes / Natural Killer cells.
- DAÑO IRREVERSIBLE DNA:** Irreversible DNA damage.
- Radiaciones ionizantes:** Ionizing radiation.
- QTX:** Quinacrine.
- Toxinas:** Toxins.
- Radicales Libres:** Free radicals.
- p53:** p53 protein.
- PROCASPASA 8:** Pro-caspase 8.
- ESTÍMULOS externos / internos:** External or internal stimuli.
- Membrana Bad, Bax:** Membrane proteins.
- Reticulo Endoplásmico:** Endoplasmic reticulum.
- PROCASPASA 12:** Pro-caspase 12.
- PROCASPASA 2:** Pro-caspase 2.
- PROCASPASA 6:** Pro-caspase 6.
- CASPASA 12 (I):** Active caspase 12.
- CASPASA 2 (E):** Active caspase 2.
- CASPASA 6 (E):** Active caspase 6.
- FRAGMENTACIÓN proteínas:** Protein fragmentation.

Common Pathways:

- Receptores:** Receptors.
- TNF-α 1 (*):** Tumor necrosis factor-α 1.
- Fas ligando:** Fas ligand.
- (S/ac . Enz. Propia):** (Self/own enzyme).
- FADD / TRADD:** Fas-associated protein with death domain / TRADD.
- DED:** Death domain.
- CASPASA 8 (I):** Active caspase 8.
- CASPASA 9 (I):** Active caspase 9.
- CASPASA 12 (I):** Active caspase 12.
- CASPASA 3 (E):** Active caspase 3.
- CASPASA 2 (E):** Active caspase 2.
- CASPASA 6 (E):** Active caspase 6.
- FRAGMENTACIÓN proteínas:** Protein fragmentation.
- APOPTOSIS:** Apoptosis.

Fuente: Adrián Jordá Vallés. De Casanova ER. Apoptosis. [www.egoncasanova .cl](http://www.egoncasanova.cl). mayo 2003.

1.7 MUERTE CELULAR EN EL ALZHEIMER

En el SNC, durante el desarrollo, se produce una tasa de muerte celular que es patogénica e incluso es necesaria para el buen funcionamiento del futuro SNC (Baehrecke., 2002). Por el contrario, una tasa elevada de muerte celular en el sistema nervioso del adulto nos indica presencia de enfermedad neurodegenerativa. La muerte celular se puede desencadenar por diversas causas como, pérdida en su correcta función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de sustancias tóxicas o por falta de nutrientes. La muerte celular por diferentes procesos y causas se lleva a cabo por mecanismos fisiológicos regulados como la apoptosis, o muerte celular programada, la autofagia y un tercer proceso que es la necrosis irreversible y sin control (Camins et al., 2008; Degterev y Yuan., 2008).

En la enfermedad de Alzheimer existen evidencias que implican dicha enfermedad con la apoptosis. En el proceso apoptótico se produce condensación de la cromatina con fragmentación de ADN y del núcleo celular que aparecen en la enfermedad de Alzheimer junto con depósitos de amiloide y de ovillos neurofibrilares (Lassmann y cols., 1995). También aparecen cuerpos apoptóticos (Lockshin y Zakeri, 2004) y

activación de caspasas (Cribbs et al., 2004) en las neuronas con ovillos neurofibrilares (Su et al., 1994). Por otra parte, mutaciones en las presenilinas ocasionan que las neuronas se vuelvan más vulnerables a la apoptosis debido a la ausencia de factores tróficos o por factores de estrés (Guo et al., 1997).

Como ya comentamos anteriormente, existen dos tipos de vías de inducción de la apoptosis, la vía intrínseca y la vía extrínseca. En la vía extrínseca se produce activación de receptores de muerte por actuación de agentes apoptóticos. Estos receptores de membrana pertenecen a la super familia de TNFR (receptores de la familia de tumor necrosis factor) (Danial y Korsmeyer., 2004). En la activación de la segunda vía, la vía intrínseca o también llamada vía mitocondrial, se ven envueltas proteínas reguladoras de la familia Bcl-2, produciéndose finalmente por la mitocondria citocromo c (Fig. 31) y AIF (factor inductor de apoptosis). Además, se forma así el complejo apoptosoma y se activan las caspasas. Las dos vías han sido relacionadas con patologías neurodegenerativas (Haass, 1999; Harada and Sugimoto, 1999; Zhang et al., 2000). El complejo IV, también llamado citocromo c oxidasa, acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del O_2 a agua y ha sido muy relacionado con las enfermedades neurodegenerativas (Haass, 1999; Zhang et al., 2000) (Fig. 31).

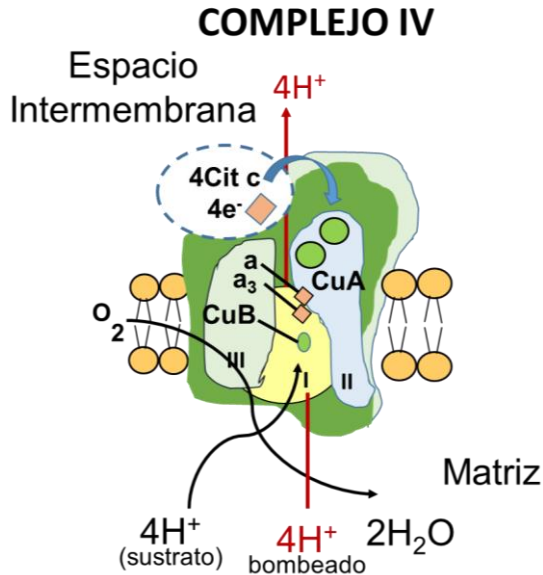


Figura 31: Complejo IV

Fuente: Adrián Jordá desde Sabroso & Suárez (2013).

La autofagia se ha visto ligada a enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (Lockshin y Zakeri, 2004). Como ha propuesto Yu y colaboradores en el 2005, la presencia de vesículas autofágicas de manera continuada, podría indicar una fuente interna de A β , ya que en las vesículas puede haber APP y secretasas que contribuirían al aumento de depósitos de A β en la enfermedad de Alzheimer (Yu et al., 2003). La relación entre autofagia y apoptosis, donde las alteraciones en la autofagia puede inducir muerte por apoptosis

en AD, ha sido indicado por diferentes autores en el año 2002 (Brunk y Terman, 2002; Tolkovsky et al., 2002). Además, cuando la vía de las caspasas, y por lo tanto la muerte por apoptosis, se encuentra inhibida se activa una vía alternativa de muerte celular, la autofagia (Camins et al., 2008).

1.8 NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD

Existen diferentes condiciones que producen neurodegeneración que inducen y conllevan a la muerte celular como son, la cascada $A\beta$, la relación con el colesterol, la hiperfosforilación de TAU, el estrés oxidativo, la inflamación, los procesos de excitotoxicidad y de cambios en el ciclo celular (Newman and Wekerie, 1998). Todos pueden afectar rutas de señalización implicadas en la muerte celular y progresión del daño (Fig. 32). Existe una comunicación entre el cerebro y la sangre que es necesaria para la alimentación y excreción de sustancias. Este órgano cerebral necesita glucosa para alimentarse y oxígeno constante para realizar sus funciones básicas. Necesita glucosa ya que es la única fuente de alimentación de este órgano, no así como otros órganos. La comunicación cerebro-sangre se ve truncada para proteínas grandes y complejas como la proteína APP que se ve incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica existente entre

cerebro y sangre. De todas maneras, en individuos con barrera hematoencefálica dañada o sin desarrollar, la proteína APP puede atravesar la barrera y producir determinados efectos.

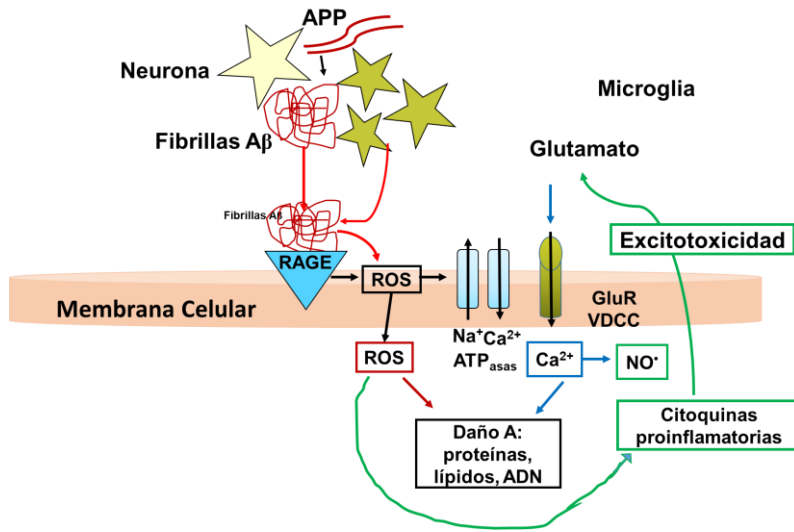


Figura 32: Fisiopatología oxidativa en el cerebro de Alzheimer

Fuente: Adrián Jordá Vallés

En el cerebro la proteína APP puede ocasionar el aumento del péptido tóxico Aβ, que se acumulará en forma de oligómeros produciéndose, posteriormente, la precipitación de la proteína formando placas amiloideas, como las encontradas en humanos después de la anatomía patológica. En cambio, en

la sangre, la presencia de la proteína A β , tras el corte de la proteína precursora APP, puede producir destrucción del péptido tóxico mediante degradación periférica, o puede unirse a la proteína RAGE que provocará la entrada del péptido al interior del cerebro, con agravamiento de la enfermedad (Fig. 33).

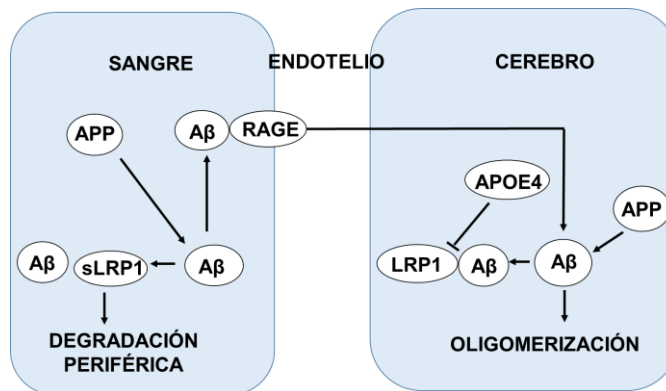


Figura 33: Cerebro, endotelio, sangre y movimiento de A β

Fuente: Adrián Jordá Vallés

Se han descrito diferentes mecanismos de la muerte de las neuronas por los depósitos del péptido A β ₁₋₄₂. Las más importantes son la hiperfosforilación de la proteína TAU y la reacción inflamatoria local. La proteína TAU se encuentra situada en el interior neuronal formando parte del citoesqueleto celular. Debido a su carácter microtubular se encarga del

transporte de sustancias, entre ellas mensajeros, sustancias tróficas y neurotransmisoras desde una parte a otra de la neurona. Para ello se dispone en forma de barras largas desde el núcleo, siguiendo por el axón y llegando hasta el botón sináptico. En la enfermedad de Alzheimer esta proteína se encuentra hiperfosforilada lo que provoca la disrupción de la proteína, su cambio conformacional y la imposibilidad de realización de sus funciones. Desde una forma regular como túbulos pasa a formar ovillos neurofibrilares enmarañados que no pueden transportar, obviamente, nada a través del axón, por lo que la célula se enfrenta a la imposibilidad de alimentarse y de distribuir tanto alimento como energía (LaFerla y Oddo, 2005) (Fig. 33). El péptido $A\beta_{1-42}$ también puede acumularse en la neurona produciendo agregación de su forma monomérica a oligomérica. Este hecho puede provocar la hiperfosforilación de TAU y la pérdida de funcionalidad tanto sináptica como a nivel de comunicación neuronal. Las mitocondrias perderán también su funcionalidad con una clara pérdida de la comunicación sináptica, disminuyendo esta de manera acumulativa y con disfunción en la homeostasis del calcio (LaFerla et al., 2007) (Fig. 34).

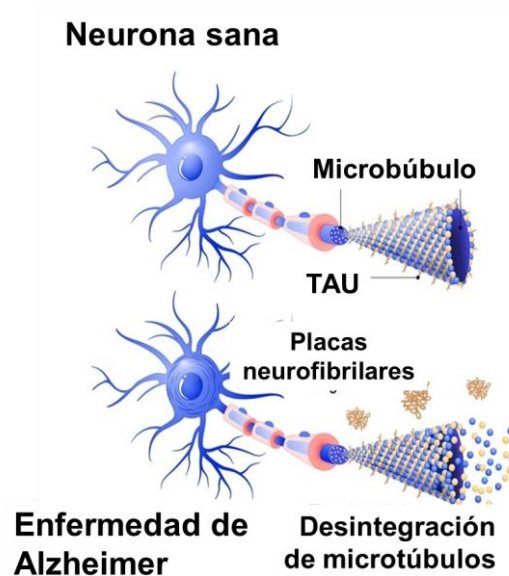


Figura 34: Proteína TAU

Fuente: Adrián Jordá de News-medical.net

En la reacción inflamatoria local es muy importante la participación de las células astrocíticas y la microglia. Se produce un aumento significativo de proteínas pro-inflamatorias, como por ejemplo las citoquinas IL-1 y TNF- α , y de estrés oxidativo mediante la liberación de sus especies reactivas (Mrak y Griffin., 2005). Además, se activan receptores como los receptores tipo Toll (Akira. 2003).

El proceso inflamatorio puede ocasionar alteraciones en la neurotransmisión con muerte celular e imposibilidad de

sinapsis entre las células (Wyss-Coray y Muckie, 2002) (Fig. 35). Diferentes citoquinas pro-apoptóticas pueden inducirse durante el proceso inflamatorio, entre ellas IL-1, TNF- α , TRAIL o FasL, que podrán inducir apoptosis en células degeneradas que expresan el receptor de muerte correspondiente.

La Figura 34 indica que las citoquinas sintetizadas y liberadas al espacio intercelular interactúan con receptores de muerte presentes en la misma célula o en células vecinas (efecto bystander), induciendo la activación de caspasas y finalmente la muerte por apoptosis. Debido a que los receptores de muerte también pueden expresarse en células normales del parénquima cerebral, puede producirse un riesgo mayor de aparición de neurotoxicidad (Wyss-Coray, 2006) (Fig. 35). Un dato a destacar es que los astrocitos contribuyen, junto con la microglia, a la eliminación mediante fagocitosis del tejido dañado por apoptosis (Lööv et al., 2012).

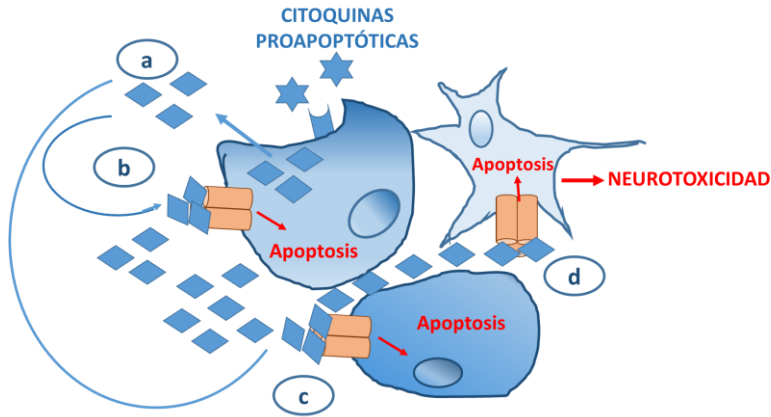


Figura 35: Neurotoxicidad celular

Citoquinas se sintetizan y liberan al espacio intercelular (a), interactúan con receptores de muerte de la misma célula (b), en células vecinas (efecto bystander) (c), induciendo la activación de caspasas y finalmente la muerte por apoptosis (d).

Fuente: Adrián Jordá

Actualmente, se cree que tanto la hiperfosforilación de la proteína TAU como la inflamación producida por la presencia del péptido $A\beta$, intervienen en el proceso de muerte celular (LaFerla y Oddo, 2005; LaFerla et al., 2007). El diagnóstico por imagen en estudios sobre enfermos de Alzheimer ha indicado que uno de los inductores posibles del proceso inflamatorio es el péptido tóxico $A\beta_{1-42}$ y por lo tanto puede inducir la activación de la microglía y de la astrogliá (Eikelenboom y van Gool., 2004; Zhu, X et al., 2004; Rothstein et al., 1996).

El proceso inflamatorio se desarrolla en dos fases. En la primera, la inflamación produce liberación de mediadores proinflamatorios que impiden la proliferación de agentes tóxicos y la vida media, protegiendo a las células dañadas (Allan y Rothwell., 2001; Allan y Rothwell., 2003). En la segunda, claramente agresiva, viene determinada por la prolongación y aumento de la cantidad de mediadores pro-inflamatorios que destruyen las células, ocasionando un aumento en la neurodegeneración detectada en la enfermedad de Alzheimer (Strohmeyer y Rogers, 2001).

Un aumento de las sustancias pro-inflamatorias (IL-1 β , Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β)) y COX-2 (Luterman et al., 2000) en el cerebro ha podido ser demostrado, tanto en estudios epidemiológicos como en modelos experimentales de Alzheimer (Griffin y Mrak., 2002; Sala et al., 2003). Estas sustancias favorecen el progreso de la enfermedad. Por otra parte, la terapia con anti-inflamatorios es capaz de disminuir el proceso degenerativo presente en estos pacientes (Rogers et al., 1993; McGeer et al., 1996; Dzenko et al., 1997; Hüll et al., 1999; Zhang et al., 2013). Estos resultados nos indican que el causante del daño neuronal posiblemente sea el proceso inflamatorio cerebral y no el acúmulo de A β , que en un principio tiene efectos neuroprotectores, pero de forma crónica posee efectos neurodegenerativos (Wyss-Coray et al.,

2002). En esta segunda fase de la enfermedad se sobreactivan las células gliales que rodean las placas amiloides, debido a la exposición al tóxico $A\beta_{1-42}$ y se induce la producción y liberación de moléculas pro-inflamatorias (Hanisch, 2015; Liu and Hong, 2003). Las moléculas pro-inflamatorias favorecen la progresión del daño ya que aumentan la sensibilidad de las neuronas a radicales libres (Combs et al., 2001). Por otra parte, también disminuye la expresión de proteínas anti-inflamatorias (Aguirre-Rueda et al., 2015a; Aguirre-Rueda et al., 2015b).

Por lo tanto, el proceso inflamatorio tiene un papel importante en la progresión de la enfermedad de Alzheimer. En un primer momento se limita el daño producido por el péptido $A\beta_{1-42}$ debido a la inflamación, que resulta beneficiosa. En una segunda fase la inflamación incrementa el estrés oxidativo, favoreciendo la neurodegeneración existente en la enfermedad.

Cuando el equilibrio de óxido-reducción se descompensa, se produce en la célula estrés oxidativo, que se caracteriza por aumento de los niveles de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ion superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^\bullet) y óxido nítrico (NO^\bullet), entre otros) (Ghosh et al., 2012). Este estado no puede ser compensado por los sistemas de defensa antioxidante, lo

que causa daño y muerte celular (Gutteridge and Halliwell, 2010). Las consecuencias de la descompensación producida pueden ser leves o crónicas (Trushina and McMurray, 2007).

Los sistemas antioxidantes pueden restablecer el equilibrio a nivel agudo, pero en el caso de llegar a un nivel crónico, encontramos alteraciones metabólicas celulares mediante la rotura de moléculas de ADN (Mecocci et al., 1994; lida et al., 2002), incremento del calcio intracelular (Yamamoto et al., 2007; Abeti y Duchen, 2012), daño en transportadores de membrana celular (Abeti y Duchen., 2012) y daño a proteínas y/o peroxidación de lípidos (Jiménez-Jiménez et al., 2006) (Fig. 36). En que las alteraciones mencionadas sean reversibles o no, influye el estado oxidativo, la edad y nutrición y factores genéticos del sujeto (Halliwell y Gutteridge., 1992; Jayasena et al., 2013; Zhang et al., 2013; Novo et al., 2013). El desequilibrio mencionado está presente en muchas enfermedades neurodegenerativas (Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013; Costacou et al., 2013), incluida la enfermedad de Alzheimer (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013) (Fig. 36).

La presencia de moléculas pro-inflamatorias inducidas por A β ₁₋₄₂ en la enfermedad de Alzheimer aumenta la

producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres por parte de las células gliales (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Sutherland et al., 2013; Phillips et al., 2013; Gubandru et al., 2013), que son las causantes de la disfunción mitocondrial (Wallace, 2000a; Lesnefsky et al., 2001; Chen et al., 2003b; Abeti and Duchen., 2012; Reddy and Beal, 2008) y de la disminución de los niveles de glutatión (GSH) (Abeti y Duchen., 2012; Johnson et al., 2012).



Figura 36: Balanza anti-oxidación y pro-oxidación

Fuente: Adrián Jordá

La peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación de ADN son los mecanismos más importantes mediante los cuales el estrés oxidativo produce daño y muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1992; Halliwell, 1992; Reiter, 1995; Jiménez-Jiménez et al., 1996; Jiménez-Jiménez et al., 2006). En modelos animales de estudio de la enfermedad de Alzheimer, la peroxidación lipídica se produce anteriormente a la formación de las placas amiloideas (Praticò et al., 2001). La mayoría de estudios en humanos demuestran que marcadores de peroxidación lipídica, como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y malonil-dialdehído (MDA) (Palmer and Burns., 1994; Lovell et al., 1995; Marcus et al., 1998; Karelson et al., 2001; Dei et al., 2002; Yu et al., 2003), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Sayre et al., 1997; Markesbery and Lovel., 1998; Gotz et al., 2002) y algunos isoprostanos (Praticò et al., 1998), están incrementados en los pacientes de Alzheimer, sobre todo en el córtex temporal y en el hipocampo. Algunas de las sustancias mencionadas pueden modificar la estructura de la apolipoproteína E3 (apoE3) y alterar su metabolismo, como ha sido demostrado por Montine y colaboradores en cultivos celulares (Montine et al., 1996). En este tipo de pacientes también se produce un acúmulo de proteínas oxidadas (Carney et al 1994), aumentos significativos de marcadores biológicos, como el contenido de proteínas carbonilo fenilhidracina-reactiva, actividad de la glutamina

sintetasa (GS) y creatina quinasa (CK) (Hensley et al., 1995), carbonil-reductasa (Balcz et al., 2001) y productos finales de glicación de proteínas (Shuvaev et al., 2001) que pueden aumentar la peroxidación lipídica (Gasic-Milenkovic et al., 2003). También presentan daño en el ADN por aumento de oxidación en diferentes zonas cerebrales, lo que ha sido relacionado con los estadios iniciales de la enfermedad (Lyras et al., 1997; Gabbitta et al., 1998; Nunomura et al., 2001; Iida et al., 2002). El aumento del estrés oxidativo también provoca incremento en la expresión génica de ERCC-80 y 89, que se relacionan con la actividad reparadora al ADN (Love et al., 1999; Yuan et al., 2001), lo que puede ser una respuesta celular al daño oxidativo (Hermon et al., 1998). En cultivos celulares, algunos de estos productos son capaces de modificar la estructura de la apolipoproteína E3 (apoE3) y alterar su metabolismo (Montine et al., 1996). Estos resultados indican que el estrés oxidativo tiene una función esencial en el desarrollo y la evolución de la enfermedad de Alzheimer.

1.9 TRATAMIENTOS PARA LA EA

Como ya vimos, estudios realizados sobre epidemiología y también en modelos experimentales (Griffin y Mrak., 2002; Sala et al., 2003) demuestran un aumento significativo de

sustancias pro-inflamatorias en el cerebro Alzheimer, como IL-1 β , el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y COX-2 (Luterman et al., 2000). Este incremento promueve el progreso de la enfermedad mientras que el tratamiento con anti-inflamatorios puede disminuir el proceso neurodegenerativo que afecta a estos pacientes (Rogers et al., 1993; McGeer et al., 1996; Dzenko et al., 1997; Hull et al., 1999; Zhang et al., 2013). Estas moléculas potencian la progresión del daño al aumentar la sensibilidad de las neuronas a los radicales libres (Combs et al., 2001). Por lo tanto, tratamientos donde se regula el nivel de inflamación cerebral podrían ayudar a la contención del desarrollo de la enfermedad.

Otras aproximaciones para controlar la enfermedad han sido dirigidas al control oxidativo producido de manera clara en dicha enfermedad. Cuando se pierde el equilibrio de óxido-reducción se produce un estrés oxidativo, caracterizado por elevación de los radicales libres y de las especies reactivas de oxígeno que no puede ser compensado por los sistemas de defensa antioxidante, conduciendo al daño y muerte celular. Estas alteraciones pueden ser reversibles o no y esto depende del estado oxidativo, de la edad y estado nutricional del individuo y de factores genéticos (Halliwell y Gutteridge., 1999; Jayasena et al., 2013; Zhang et al., 2013; Novo et al., 2013). Este desequilibrio es característico de muchas enfermedades

neurodegenerativas (Halliwell y Gutteridge., 1992; Quintanilla et al., 2012; Costacou et al., 2013) incluida la enfermedad de Alzheimer (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013).

La presencia de moléculas pro-inflamatorias inducidas por $A\beta_{1-42}$ en la enfermedad de Alzheimer estimula la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres por las células gliales (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Sutherland et al., 2013; Phillips et al., 2013; Gubandru et al., 2013) responsables de la disfunción mitocondrial (Wallace, 2000; Lesnefsky et al., 2001; Chen et al., 2003b; Abeti y Duchen., 2012) y de la reducción de los niveles de glutatión (GSH) (Abeti y Duchen, 2012; Johnson et al., 2012). Los mecanismos de daño y muerte ocasionados por el estrés oxidativo son, la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación de ADN (Halliwell y Gutteridge., 1992; Halliwell., 1992; Reiter., 1995; Jiménez-Jiménez et al., 1996; Jiménez-Jiménez et al., 2006).

Tanto el estrés oxidativo como la inflamación son mecanismos desencadenantes de la patología de esta enfermedad por lo que tanto su estudio como sus posibles interacciones, pueden contribuir al desarrollo de nuevas

terapias farmacológicas en el tratamiento del Alzheimer. Desde el punto de vista no farmacológico, diversas estrategias se han considerado beneficiosas en cuanto a la mejora del bienestar y calidad de vida de los pacientes (Olazarán et al., 2004; Guetin et al., 2009; Ramesh et al., 2018; De Sant'Anna and Morat., 2013). Maniobras como la musicoterapia, fisioterapia, psicomotricidad, cuidados básicos, terapia ocupacional, laboraterapia, terapia con animales y la psicoestimulación cognitiva se consideran herramientas muy útiles encaminadas a ejercitar y reforzar capacidades cognitivas que todavía preserva el paciente de Alzheimer sin pretender recuperar las que ya se han perdido (Olazarán et al., 2004; Guetin et al., 2009; de Sant'Anna y Morat., 2013).

En la actualidad, no existe una cura para la enfermedad de Alzheimer y su progreso tampoco puede ser desacelerado. El uso de fármacos como terapia se ha dirigido a retrasar y controlar los síntomas con el fin de mejorar la calidad de vida y el bienestar del los pacientes pero con nula efectividad. Además, existen multitud de efectos secundarios que presentan estos medicamentos. En los últimos años se han intensificado las investigaciones para el estudio de los efectos acaecidos en la enfermedad como el uso de neuroprotectores antioxidantes y antiinflamatorios. También el uso de compuestos naturales basados en el control nutricional por

plantas sobre diferentes vías de señalización asociadas a la inflamación y al estrés oxidativo.

1.10 RANOLAZINA Y ALZHEIMER

La ranolazina (Rn) [(+)-N-(2,6-dimetilfenil)-4(2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)-propil)-1-piperazina acetamida], un derivado de la piperazina, está indicada para el tratamiento de la angina crónica estable, en combinación con otros fármacos anti-isquémicos (Siddiqui and Keam, 2006; Sossalla and Maier, 2012), aunque, en los últimos años (desde su aprobación por la FDA en 2006), sus indicaciones clínicas han aumentado, especialmente en el tratamiento de las arritmias (Chaitman, 2006; Chen et al., 2009) siendo un fármaco de especial interés en la fibrilación auricular (Capucci et al., 2018) o en diferentes tipos de insuficiencia cardíaca, tanto sistólica como diastólica (Gould et al., 2009) (Fig. 37).

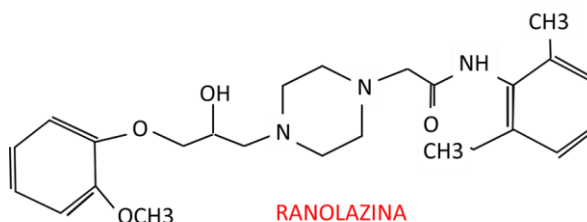


Figura 37: Ranolazina

Fuente: Adrián Jordá

En contraste con otros agentes, la Rn no modifica significativamente la presión arterial sistémica, la frecuencia cardíaca (Chaitman et al, 2004a; Chaitman et al, 2004b) ni la conducción auriculoventricular. Recientemente se ha postulado su efecto beneficioso en la disfunción diastólica inducida por estrés oxidativo cardíaco (Lovelock et al., 2012) así como en diferentes tipos de angina como la microvascular (Villano et al., 2013) e incluso en pacientes diabéticos tipo II en los que, además de sus efectos cardíacos, disminuye los niveles de glucemia y hemoglobina glicosilada, facilitando en especial la liberación de insulina (Skolnik et al., 1993). Diferentes estudios multicéntricos han evidenciado los citados efectos antidiabéticos del fármaco (Morrow et al., 2009; Arnold et al., 2015; Weisz et al., 2016; Fanaroff et al., 2017; Gilbert et al., 2018) aunque no son concluyentes sobre su posible intervención en el sentido de facilitar los efectos periféricos de la insulina al disminuir la resistencia tisular a la hormona. Estudios electrofisiológicos demuestran que la ranolazina posee propiedades anti-arritmicas ya que bloquea preferentemente la corriente tardía de sodio (INaL) sobre el pico, que ha de producirse, de la corriente rápida de sodio (INa) (Undrovinas et al., 2006) (Fig. 38).

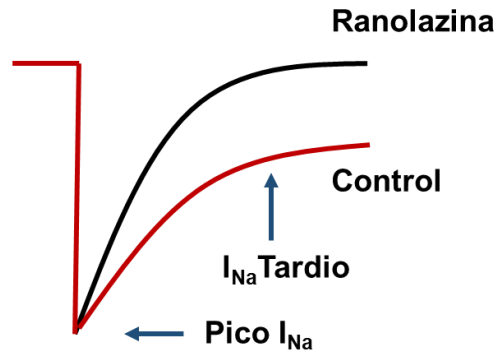


Figura 38: Electrofisiología en neuronas control y con Ranolazina

Fuente: Wu et al., 2004.

Su papel protector en la isquemia coronaria ha despertado el interés por estudiar sus efectos en vasos periféricos. En este sentido se ha evidenciado que induce vasodilatación en diferentes lechos vasculares como el coronario y femoral del cerdo (Nieminen et al. 2011) o el braquial humano (Lamendola et al., 2013). En algunos de los estudios la vasodilatación parece depender de la liberación de factores endoteliales como el óxido nítrico (Deshmukh et al. 2009) o el factor hiperpolarizante de origen endotelial (EDHF), aunque en otros su efecto vasodilatador parece independiente de la funcionalidad endotelial o puede depender del bloqueo de inhibidores endógenos de la síntesis de NO como la dimetilarginina asimétrica (ADMA) (Deshmukh et al. 2009).

Otro aspecto de interés es la actividad antioxidante del fármaco. En este sentido son varias las evidencias indicando que la RN disminuye el estrés oxidativo implicado en múltiples disfunciones mecánicas miocárdicas y diferentes tipos de arritmias, bien modulando la formación de ROS (Lovelock et al., 2012; Riccio et al., 2018) o facilitando la función de diferentes SOD (MnSOD y Cu/ZnSOD) (Aldasoro et al., 2016). Los efectos de interés terapéutico se extienden a patologías neurológicas como la propuesta para su uso en el tratamiento de la epilepsia (Kahlig et al., 2010) o del dolor crónico (Gould et al., 2014). Por esta causa, en nuestro laboratorio hemos objetivado efectos antiinflamatorios, antioxidantes y promotores de la viabilidad celular en cultivos de astrocitos de rata (Aldasoro et al., 2016) y en funcionalidad arterial (Vallés et al., mandado a publicar).

1.11 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA RANOLAZINA

En condiciones fisiológicas, la estimulación de las células musculares auriculares y ventriculares así como las células de Purkinje (una clase de neurona GABAérgica) produce la activación-apertura de los canales de Na^+ , generándose una corriente de entrada de sodio (I_{Na}) que despolariza el potencial de membrana y origina la fase 0 del potencial de acción

cardíaco. Al cabo de 1-3 ms, estos canales pasan al estado inactivo (sin permitir la entrada de Na^+ al interior celular) excepto un pequeño porcentaje de canales de Na^+ que se inactivan-cierran pero vuelven a abrirse de forma repetida durante la fase 2 del potencial de acción (Fig. 39). Esto genera una corriente tardía o lenta de entrada de Na^+ al interior celular denominada I_{NaL} , que será la encargada de regular la duración del potencial de acción cardíaco.

La ranolazina inhibe selectivamente la I_{NaL} (corriente tardía de entrada de Na^+), reduce la acumulación intracelular de Na^+ y la posterior de Ca^{2+} inducido por el Na^+ , así como las anomalías mecánicas, eléctricas y metabólicas en el miocardio isquémico (Chaitman, 2006; Shryock et al., 2008). En diversos ensayos clínicos realizados en pacientes con angina crónica estable, la ranolazina ejerce acciones antianginosas y antiisquémicas y, en pacientes con síndrome coronario agudo, ejerce acciones antiarrítmicas (Zaza et al. 2008; Saint 2008; Mugelli y Tamargo. 2009). A concentraciones terapéuticas, la ranolazina produce un bloqueo de la IL. Sin embargo, la ranolazina no modifica la I_{Na} encargada de la fase 0 del potencial de acción, ni la corriente de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}) (Belardinelli et al. 2006; Mugelli y Tamargo, 2009). Ello explica por qué la ranolazina no modifica la contractilidad y la frecuencia cardíacas, la conducción intraauricular o

intraventricular, las resistencias vasculares periféricas o la presión arterial (Von Lewinski et al., 2005).

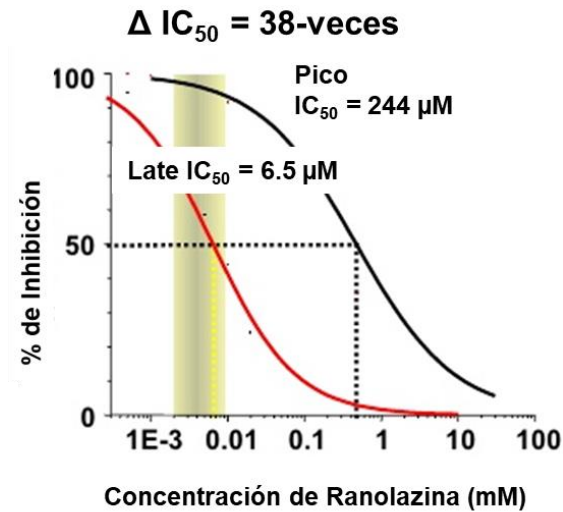


Figura 39: Miocitos ventriculares caninos con fallo cardíaco

Fuente: Undrovinas et al., 2006

Como consecuencia del bloqueo de la I_{NaL} , la ranolazina disminuye la Na^+i , inhibe la actividad del intercambiador Na^+-Ca^{2+} y la $Ca^{2+}i$, preserva la homeostasis iónica intracardiaca, reduce la tensión de la pared ventricular y mejora la distensibilidad y la relajación ventricular (Antzelevitch et al., 2004; Fraser et al., 1994; Be-lardinelli et al., 2006). El aumento de sodio en

el interior celular Na^+_{i} promueve la activación, de forma indirecta o inversa, del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que facilitará la entrada de Ca^{2+} en la célula (por cada 3 Na^+ que salen del interior celular entra 1 Ca^{2+}). La acumulación de Ca^{2+} intracelular ($\text{Ca}^{2+}_{\text{i}}$) por su parte, produce efectos deletéreos (Zaza A et al., 2008; Saint DA, 2008; Mugelli A y Tamargo J, 2009; Bers DM et al., 2003; Murphy E y Steenbergen C, 2008; Hale SL et al., 2008; Hasenfuuss G y Maier LS, 2008; Stone PH, 2008) como son la disfunción eléctrica, disfunción mecánica y disfunción metabólica, conduciendo de esta manera a una situación fisiopatológica (Fig. 40).

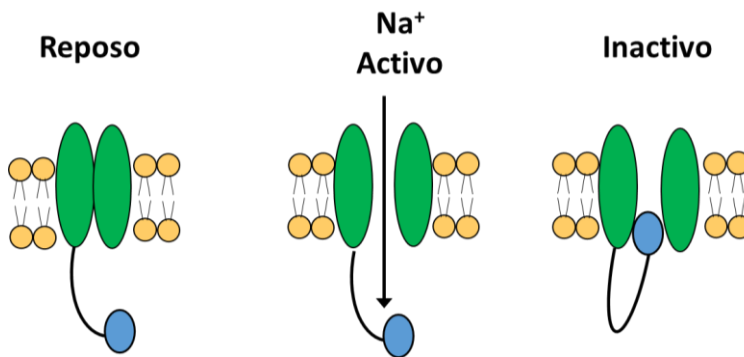


Figura 40: Neuronas control y con Ranolazina

Fuente: Adrián Jordá.

En relación con este mecanismo (Tamargo J et al., 2010), la Rn produce beneficios cardiovasculares mediante la inhibición de la corriente tardía de sodio hacia el interior (I_{NaL})

(Shryock y Belardinelli, 2008). Esto se produce ya que la amplitud de la corriente tardía de I_{NaL} se incrementa en muchas situaciones patológicas, como la isquemia miocárdica y el estrés oxidativo (Aldakkak et al, 2011; Sokolov et al., 2007).

A concentraciones terapéuticas, la Rn inhibe los canales de la corriente tardía de sodio (I_{NaL}) (Schram et al., 2004) y de esta manera, inactivan de forma indirecta los canales de entrada de calcio al interior celular, lo que reduce el daño tisular causado por el sodio intracelular y la sobrecarga de calcio asociada a la isquemia miocárdica (Chaitman, 2006; Belardinelli et al., 2006). Además de sus efectos antianginosos, la Rn actúa como un agente antiinflamatorio mediante la reducción de la proteína dimetilarginina asimétrica y de los niveles plasmáticos de proteína C-reactiva (PCR) y además mediante la liberación de mediadores vasodilatadores endoteliales en los pacientes con enfermedad coronaria isquémica (Deshmukh et al., 2009). Cabe destacar que se han descrito efectos metabólicos tales como la disminución de la hemoglobina A1c (HbA1c) en pacientes con cardiopatía isquémica y diabetes (Morrow et al., 2009). Por otra parte, se ha detectado en ratones diabéticos una mejora de la secreción de insulina y de la supervivencia de las células β en estos ratones diabéticos (Ning et al., 2011) (Fig. 41).

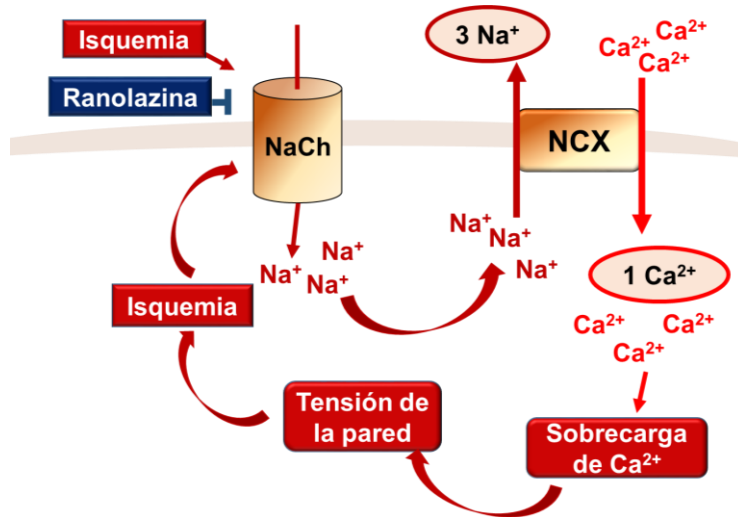


Figura 41: Ranolazina e isquemia

Fuente: Adrián Jordá

Por otra parte, varios estudios han evaluado los efectos de Rn en el SNC. Al disminuir la excitabilidad neuronal, la Rn actúa como un agente anticonvulsivo (Peters et al, 2013; Park et al, 2013), y se ha propuesto como un posible tratamiento para el dolor neuropático (Gould et al., 2009). Se ha sugerido que estos efectos podrían estar mediados por los canales tardíos de I_{NaL} o por la rectificación de la corriente interna de K^+ (Chen et al., 2009), lo que permite el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para el dolor crónico (Cummins et al., 2007), así como para los trastornos epilépticos (Kählig et al., 2010). Diferentes estudios indican que la ranolazina se

comporta como antagonista adrenérgico (Lee et al., 2011). Se ha evidenciado un efecto antagónico alfa 1 por parte de la ranolazina en arterias intrarrenales de rata (Deng et al., 2012) o en aorta de conejo (Malavaki et al., 2015) y de rata (Virsolvy et al., 2015), aunque se trata de estudios realizados administrando noradrenalina exógena (sin valorar la interacción con el sistema nervioso adrenérgico) con lo que las concentraciones plasmáticas del transmisor son significativamente mayores que las fisiológicas y se obvian otros transmisores o cotransmisores que pueden modificar las respuestas. En experimentos in vivo llevados a cabo en ratas se puso de manifiesto un doble bloqueo de receptores beta 1 y beta 2 por parte de la ranolazina que únicamente provocó cambios cronotrópicos cardiacos (bradicardia) cuando se practicó vagotomía bilateral (Létienne et al., 2001) por lo que se trataría de un antagonismo débil sobre los receptores beta 1 y 2 adrenérgicos. Por otra parte, en perros conscientes, la ranolazina se comportó como un antagonista débil tanto de receptores alfa como betaadrenérgicos (Zhao et al., 2011), antagonismo que se potenció al bloquear el sistema nervioso autónomo. El antagonismo adrenérgico también se ha descrito en cardiomiocitos humanos (Morotti et al., 2016) o en estudios clínicos (Chait-man et al., 2004; Opie and Knuuti 2009). Experimentos previos en nuestro laboratorio, han puesto en evidencia el efecto antagonista alfa adrenérgico de la

ranolazina sin necesidad de bloquear el sistema nervioso autónomo. No obstante, queda por establecer este efecto de la ranolazina sobre el sistema adrenérgico en otras especies y especialmente en el hombre. Su interés farmacológico es evidente, especialmente en enfermedades que cursan o son originadas por disfunciones adrenérgicas, tanto cardíacas como vasculares, como la diabetes mellitus tipo 2. En este sentido sería interesante plantear nuevos estudios sobre la posible implicación del antagonismo adrenérgico en los efectos antiinflamatorios, antioxidantes y metabólicos, especialmente los antidiabéticos, de la ranolazina.

1.12 EL CICLO CELULAR

El ciclo celular es un conjunto de pasos que culminan con el crecimiento de la célula y su división. Para que ocurra una apropiada división y proliferación, toda célula eucariota debe seguir un correcto programa genético, el cual hace que ésta pase por diferentes fases y culmine en la división celular. Sin embargo, para que esto suceda se necesita la replicación del genoma, la distribución equitativa de la masa celular y una segregación precisa de cromosomas. La ejecución de esos eventos divide al ciclo celular en cinco fases (Fig. 42):

- Crecimiento 1 (G1)

- Síntesis (S)
- Crecimiento 2 (G₂)
- Mitosis (M)

La quinta fase se denomina G₀ ya que queda fuera del ciclo celular. En esta fase la célula está "quiescente", es decir, no está en división, por lo que se encuentra fuera del ciclo celular.

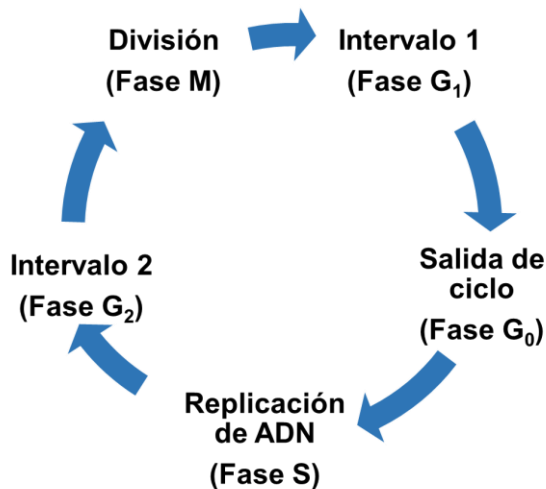


Figura 42: Ciclo celular

Fuente: Adrián Jordá

La fase G₁, llamada primera fase de crecimiento, se inicia con una célula que proviene de una división previa. Durante esta fase se capacita a la célula para crecer y producir todas

las proteínas necesarias para la síntesis del ADN. La célula aumenta de tamaño y se sintetiza nuevo material citoplásmico, sobre todo proteínas y ARN.

La fase S o de síntesis, es el periodo en que tiene lugar la duplicación del ADN. Cuando termina, el núcleo contiene el doble de ADN y proteínas nucleares. Esto asegura que al dividirse cada una de las células tenga una copia completa de ADN.

En la fase G2, segunda fase de crecimiento, se sigue sintetizando ARN y proteínas, se incrementan las proteínas citoplasmáticas y organelos, por lo que la célula aumenta de tamaño y hay cambios visibles en la estructura celular que nos indican el principio de la mitosis o división celular.

Al periodo de tiempo que transcurre entre dos mitosis, y que comprende los periodos G1, S y G2, se le denomina interfase (Karp, 2008). La fase M o mitosis, es cuando ocurre la división nuclear y celular. En este periodo los cromosomas se separan y ocurre la citocinesis. Las células de mamífero proliferan solo cuando son estimuladas para hacerlo a través de señales intracelulares (factores de transcripción) y

extracelulares (factores de crecimiento, hormonas o mitógenos). Si se priva de tales señales, el ciclo celular se detendrá en un punto de control G1 y la célula entrará en el estado G0. La célula puede permanecer en G0 por días, semanas, o incluso años antes de que se divida otra vez. Una vez que recibe nuevamente señales, sobre todo extracelulares, son estimuladas a salir de G0 y entran a G1 para iniciar un nuevo ciclo de división (Rodríguez et al., 2004). Durante la fase de G0, la maquinaria de ciclo de célula es desmontada y las Ciclinas y la Quinasa dependiente de ciclina desaparece. Las células entonces permanecen en la fase de G0 hasta que haya una razón en ellas para dividirse; mientras tanto son metabólicamente activas a pesar de que ha cesado su crecimiento. Algunas células de organismos maduros, como las células parénquima del hígado y el riñón, entran en la fase de G0 semipermanentemente y sólo pueden comenzar a dividirse otra vez en circunstancias muy específicas. Otros tipos de células, como células epiteliales, siguen dividiéndose en todos los periodos de la vida del organismo y raras veces entran en G0. Como conclusión, el aumento de la concentración del péptido tóxico A β es una de las características de la enfermedad de Alzheimer así como la presencia de la proteína TAU hiperfosforilada y situada en el interior de las neuronas. La enfermedad de Alzheimer es una patología degenerativa que cursa con acúmulo de placas neuríticas (encontrándose en

ellas el péptido tóxico) y ovillos neurofibrilares (producidos por hipofosforilación de la proteína TAU), responsables de la pérdida neuronal, el deterioro en las conexiones sinápticas y de la gliosis reactiva de respuesta inflamatoria (Giulian, 1999; Wyss-Coray and Mucke, 2002; Mrak and Griffin, 2005). Crucial también en esta enfermedad es el estado oxidativo donde el estrés oxidativo celular provoca aumento de marcadores de daño oxidativo tanto a proteínas, lípidos, ADN, ARN o a procesos como biogénesis mitocondrial, metilación e incluso acetilación (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013). Por otra parte, la inflamación, aparecida con anterioridad o con posterioridad al estrés oxidativo, presenta también un papel fundamental en el desarrollo y la evolución de la enfermedad de Alzheimer. A nivel celular, la integridad neuronal, así como el buen funcionamiento de los astrocitos, juegan un papel fundamental en la recuperación y no avance de la enfermedad de Alzheimer. Los astrocitos, al igual que la microglia, como células inmunológicas del cerebro, pueden poseer gran importancia como diana terapéutica en respuesta a procesos inflamatorios (Fuller et al., 2010; de Oliveira et al., 2010; Furman et al., 2012) y de estrés oxidativo (Zhu et al., 2007b; Agostinho et al., 2010).

2.HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El péptido $A\beta_{1-42}$ podría ser tóxico para las neuronas y/o astrocitos en cultivo primario. Resultados previos indican que los astrocitos son células de protección para las neuronas y que podrían proteger de la inflamación y del estrés oxidativo inducido por el péptido $A\beta_{1-42}$ en las células cerebrales en cultivo primario. También el fármaco Ranolazina tendría un efecto protector en las células neurales.

3.OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Estudiar los efectos del péptido tóxico $A\beta_{1-42}$ en cultivos primarios independientes de neuronas y astrocitos.
2. Estudio de los marcadores implicados en la neuroinflamación y estrés oxidativo inducidos por el péptido $A\beta_{1-42}$ en cultivo mixto de neuronas y astrocitos.
3. Si se apreciaran diferencias significativas en los puntos anteriores, se analizaría si los cambios podrían incidir en alguno de los siguientes aspectos:
 - 3.1 Viabilidad celular
 - 3.2 Apoptosis
 - 3.3 Estrés oxidativo
 - 3.4 Biogénesis mitocondrial
 - 3.5 Inflamación
4. Efectos de la ranolazina en la respuesta inflamatoria y estrés oxidativo inducidos por $A\beta_{1-42}$ en astrocitos en cultivo primario.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS

Todos los reactivos fueron usados para los análisis o para la purificación de los cultivos:

- DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) se utiliza ampliamente como un medio basal para fomentar el crecimiento de diferentes células de mamíferos. Las células cultivadas exitosamente en DMEM incluyen fibroblastos primarios, neuronas, células gliales y células del músculo liso (Gibco life Technology: Gibco Invitrogen Corporation, Barcelona. España).
- SFB (suero bovino fetal o *Fetal Bovine Serum* FBS), es una fracción de la sangre obtenida después de la coagulación y la centrifugación para eliminar los eritrocitos. Para la utilización en cultivos se debe neutralizar mediante calentamiento a 60° C durante media hora (Gibco life Technology: Gibco Invitrogen Corporation, Barcelona. España).

- Ara-C-citosina- β -D-arabinofuranosido-clorídico ($C_9H_{13}N_3O_5 \cdot HCl$), fosforilación de la Ara-CTP y se incorpora al ADN. Inhibe la replicación del ADN mediante la formación de complejos de membrana con la enzima topoisomerasa I produciendo la fragmentación del ADN e induciendo la apoptosis. No inhibe la síntesis de ARN y es agente antileucémico. Se utiliza para prevenir la proliferación de la glía. (Sigma-Aldrich Biotech, Madrid, España).
- Polímero PDL Poly-D-lisina se utiliza en la preparación de las superficies de las placas de cultivo, con el fin de conseguir la fijación neuronal. También se puede usar con las células que digieren los polímeros de poli-L-lisina y causan una absorción excesiva de L- lisina (Sigma-Aldrich Biotechnology, Barcelona, España).
- Anti-MAP-2, es para un anticuerpo monoclonal MAP-2 (1:500 para el WB y 1:5000 para ELISA). Está asociado a los microtúbulos y es una proteína del citoesqueleto, importante en neuronas y pertenece a una familia de proteínas asociadas a los microtúbulos estables al calor (Santa Cruz Biotechnology, Barcelona, España).

- Anti-GFAP es un anticuerpo monoclonal anti-proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (1:500). Marcador específico de astrocitos y distingue a los astrocitos diferenciados de otras células gliales durante el desarrollo del SNC (Sigma-Aldrich Biotechnology, Madrid, España).
- Anti-Smac/DIABLO (1:500) revela los aminoácidos N - terminales para la unión de Smac/DIABLO a IAP y la activación de las caspasas, y es expresado en una variedad de tejidos humanos y de ratón (Sigma-Aldrich Biotechnology, Madrid, España).
- Anti-receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR- γ) monoclonal (1:250) obtenido de Sigma Aldrich Biotechnology, Madrid, España).
- Anti-NF- κ B (Nuclear factor- κ B) (1:1000) obtenido de Sigma Aldrich Biotechnology
- Anti-Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) policlonal (1:250) obtenido de Assay Designs, Madrid, España).
- Anti-Mn superóxido dismutasa (Mn-SOD) monoclonal (1:500) obtenido de Cell signalling, Beverly, MA, USA).

- Anti-tubulina monoclonal (1:1000) obtenido de Cell signalling (Beverly, MA, USA).
- Amiloide β_{1-42} (péptido tóxico) o β_{40-1} (péptido control) diluidos en 100 μ M en tampón fosfato salino (PBS). La preparación del oligomero se realizó dejando el tubo preparado 24 h a 37°C, siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich, Barcelona, España).

4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales de experimentación empleados para el desarrollo de los ensayos *in vivo* fueron ratas hembras de la raza “*Sprague Dawley*” criadas y mantenidas en condiciones higiénicas, de climatización, de humedad y con ciclos de luz/oscuridad de 12/12h, en el animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia. Las ratas hembras fueron alimentadas con dieta sólida estándar y agua *ad libitum*. Se expusieron al macho y, tras confirmar al siguiente día la presencia de espermatozoides en el tracto vaginal, se aislaron durante 21 días para el cultivo de astrocitos o para 15 días para el de neuronas. Las ratas fueron sacrificadas para extraer los cerebros de los fetos con el fin de realizar el protocolo de cultivo primario de astrocitos, de neuronas o de cultivo mixto (Vallés et al., 2010). Los animales

fueron usados, en su justo número, con la intención de minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados siguiendo los comités de ética locales (Comité de Ética para la investigación animal de la Universidad de Valencia, con código de autorización: 2016/VSC/PEA/00220 tipo 2) basándonos en las guías nacionales y europeas.

El Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, artículo 33, establece las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia. La Ley 32/2007 (art.7), para el cuidado de los animales, transporte, experimentación y sacrificio (B.O.E nº 34/2013) fueron reglamentados por el Parlamento Europeo y el Consejo con el fin de adoptar la Directiva 2010/63/UE, en sus artículos 59.2 y 47.5, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

La Comisión Europea, a través de la Recomendación 2007/526/CE de junio de 2007, estableció las directrices relativas al alojamiento y cuidado de los animales utilizados para experimentación.

4.3 ENSAYOS

4.3.1 ENSAYO LOWRY

Es un ensayo bioquímico para la determinación del nivel total de las proteínas en una disolución, donde la concentración total de proteínas se detecta por la diferencia de color con respecto a una proteína dada (BSA = Suero albumina bovina).

4.3.2 ENSAYO MTT

Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa dando un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas (Stokert et al., 2012). Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Por lo tanto, la viabilidad celular de los cultivos se determinó por el ensayo MTT (Fig. 43). Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron con los productos durante 24 h. Después de los tratamientos de células, el medio se retiró y las células corticales se incubaron con medio sin rojo fenol (propio del DMEM),

concretamente en solución de MTT [0.5 mg/ml, preparado en solución salina de tampón fosfato (PBS) durante 4 h a 37°C]. Finalmente, se retiró el medio y las partículas de formazán se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (DMSO). La viabilidad celular, definida como la cantidad relativa de la reducción de MTT, se determinó por espectrofotometría a 570 nm.

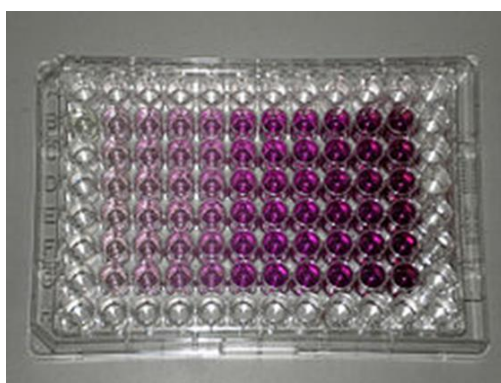


Figura 43: Ensayo MTT

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico para la evaluación de la actividad metabólica celular, por el que se refleja el número de células viables presentes. Se trata de un ensayo dependiente de las proteínas NADPH, enzimas que son capaces de reducir el colorante de tetrazolio MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a su formazán insoluble, que tiene un color púrpura.

La absorbancia de esta solución de color puede cuantificarse mediante la medición en una cierta longitud de onda (por lo general entre 500 y 600 nm, concretamente 570 nm) mediante un espectrofotómetro. Las células con un metabolismo muy bajo reducen poca cantidad de MTT mientras que las que se dividen rápidamente exhiben altas tasas de reducción de dicho compuesto. Se utiliza esta técnica puesto que los ensayos de colorante de tetrazolio no solo se usan para medir la viabilidad celular sino que también indican la citotoxicidad (pérdida de células viables) y la actividad citostática (cambio de la proliferación celular al estado de quiescencia) en un mismo paso, por lo que son buenos indicadores de estas situaciones.

4.3.3 ENSAYO ACTIVIDAD CASPASA 3

La actividad de la Caspasa-3 fue medida con un Kit Apo Alert CPP32/Caspasa 3, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (CLONTECH, Palo Alto, CA). Células adheridas a placa, se levantaron con tripsina y se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. El precipitado se guardó a -80°C. El día del ensayo el precipitado fue solubilizado en tampón de lisis y centrifugado para eliminar los desechos celulares (Fig. 44).

Las muestras conteniendo igual cantidad de proteína se incubaron con 50 μ M N-acetyl-Asp-Glut-Val-Asp-AFC (7-amino-4-trifluorometil coumarin) durante una hora a 37°C. El resultado de color se analizó usando un lector de placas de ensayos inmuno-enzimáticos de 360 nm de excitación y de 350 nm de emisión.

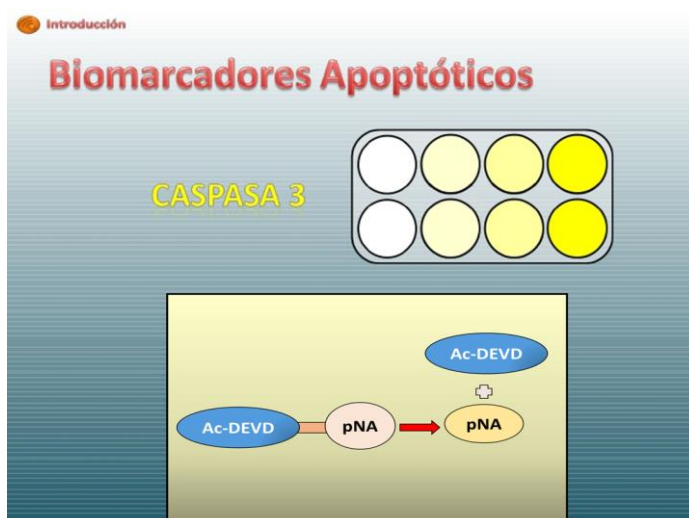


Figura 44: Ensayo Caspasa 3

4.3.4 DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO

Los niveles de malondialdehído (MDA) fueron analizados por cromatografía líquida de alta definición. Las células se homogeneizaron y centrifugaron. Los sobrenadantes fueron recolectados y guardados en hielo. Las muestras se

hidrolizaron mediante la ebullición en ácido fosfórico diluido. En el ensayo de MDA uno de los productos finales formados de bajo peso molecular, debido a la oxidación lipídica, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos de MDA-TBA que fueron eluidos con tampón de metanol-fosfato para después cuantificarse mediante espectrofotometría a 532 nm.

4.3.5 ANÁLISIS DE INMUNO-TRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)

Las células cultivadas se trataron con tampón de lisis y luego fueron mecánicamente degradados para liberar las proteínas. La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Lowry modificado (Peterson, 1977). La determinación cuantitativa de la concentración de proteínas es una de las pruebas que más frecuentemente deben hacerse en el laboratorio y los métodos colorimétricos han permitido solventar el problema de cantidad de proteína por condición. En este caso se utiliza el método de Lowry puesto que éste tiene la ventaja de ser extremadamente sensible, tanto que es capaz de detectar cantidades del orden de 10 µg de proteína. El inconveniente que presenta es que al evaluar los fenoles de la proteína (residuos de tiroxina), la intensidad de color resultante varía entre las distintas proteínas. Pero podemos solventar también este problema ya que es posible calibrar el

método con alguna proteína comercial conocida, como es la seroalbúmina bovina (BSA).

Añadiendo el tampón (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,5% (v/v), 2-mercaptoetanol, 1% azul de bromofenol y 19% de glicerol) a la muestra de proteína, se obtuvo la liberación de las proteínas y la ruptura celular. Las proteínas obtenidas se calentaron durante 5 min a 95°C para desnaturalizar las proteínas, antes de proceder a la carga en gel.

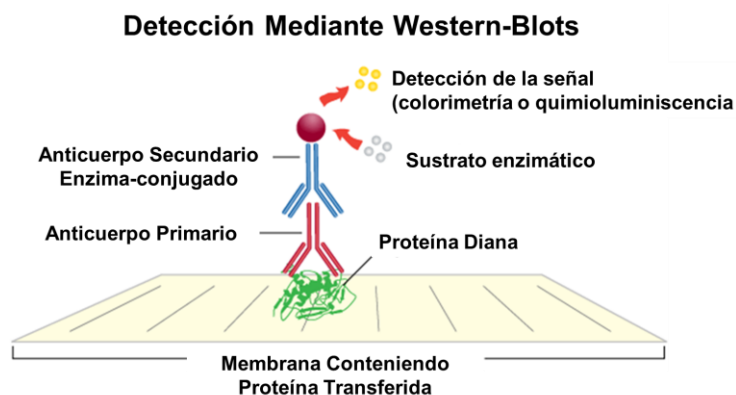


Figura 45: Detección de las proteínas mediante Western Blot

Las proteínas se separan en geles de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis). Es una técnica muy utilizada para la separación de proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de su cadena polipeptídica, masa molecular, modificaciones post-traduccionales y otros factores). Las proteínas se

desnaturalizan y forman micelas, las cuales, al ser sometidas a un campo eléctrico, son capaces de migrar influenciadas solo por su tamaño. Dichos geles son transferidos a membranas de nitrocelulosa o de PVDF (poli-vinilo de fluoruro) en un ambiente húmedo utilizando un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, 20% de metanol). El uso de membranas de nitrocelulosa o de PVDF depende de la potencia de la señal que se pretende. Para anticuerpos con alta señal se puede usar nitrocelulosa. Para anticuerpos con señales más bajas se debe usar PVDF. Las membranas se bloquearon con 5% de leche o 5% de suero albúmina bovina (BSA) en TBS-T (0,05% de Tween-20) durante media hora y se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con tampón de lavado TBS-T (TBS, 0,2% Tween-20) y se incubaron con un anticuerpo secundario, bien anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón (Cell Señalización Tecnologías de Danvers, MA), anticuerpos conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h. El uso de la leche o del BSA depende de la potencia de anticuerpo, ya que usando BSA se consigue mayor fuerza de la señal.

Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y las proteínas se detectaron utilizando el método de ECL tal como se especifica por el fabricante. Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting es un sustrato de peroxidasa que aumenta la

quimioluminiscencia (ECL) detectando la peroxidasa de rábano picante. Es un método sencillo y barato que sustituye a los productos más costosos sin necesidad de volver a optimizar las condiciones de sondeo o protocolos de incubación que hay que llevar a cabo con otros productos de otras casas comerciales o incluso de otros métodos. Se estudiaron las señales de autorradiografía utilizando el sistema de imagen digital ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

4.3.6 DETERMINACIÓN NIVELES DE PERÓXIDOS

Para determinar los niveles de peróxidos se usó una modificación del método descrito por Barja y colaboradores (Barja, 1999). Las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente incubadas a 37°C con una solución de PBS conteniendo 0.1 mM de ácido monovalínico y 6 U/ml de peroxidasa de rábano. La incubación se detuvo a los 5 minutos con tampón frío de glicina 2 M conteniendo 50 mM EDTA y 2.2 mM NaOH. El sobrenadante se midió por fluorescencia (312 nm de excitación y 420 nm de emisión).

4.3.7 BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN ASTROCITOS

La agregación mitocondrial se determinó mediante fluorescencia con Mitotracker (250 nM) para teñir las

mitocondrias. La tinción nuclear se llevó a cabo mediante Hoechst 33342 (2 µg/ml). Con el fin de determinar la fluorescencia se utilizó microscopía confocal. Dado que el producto Mitotracker podría ser sensible a los cambios de potencial de membrana mitocondrial produciendo alteración en la tinción mitocondrial, usamos también inmunofluorescencia con el anticuerpo Tom-20 para determinar la biogénesis mitocondrial.

4.3.8 KITS DE ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para Interleukina 1β (IL-1β) y TNF-α. Las células fueron cultivadas y, a la hora del ensayo, el medio de rojo fenol fue eliminado y reemplazado por PBS que contenía 1 mg/ml de BSA, en presencia o ausencia de los productos a determinar. La concentración de IL-1β y TNF-α (pg/ml) fue determinada usando kits de ELISA (Pierce Biotechnology, Inc.).

4.3.9 TIPOS DE TINCIONES

Las tinciones utilizadas en este estudio fueron las siguientes:

- La tinción Hoechst 33342, colorante fluorescente utilizado para teñir el ADN y el ARN. Emite una

fluorescencia azul cuando se une a ADN, núcleos y mitocondrias. Se emplea en la microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (FACS), para distinguir núcleos picnóticos condensados en células apoptóticas, así como para realizar estudios de ciclo celular en combinación con tinción BrdU (Molecular Probes).

- MitoTracker® Deep Red FM es un colorante rojo fluorescente (absorbancia/emisión~644/665nm) que tiñe las mitocondrias de las células vivas. Se utilizará para la localización de mitocondrias vivas. El colorante se conserva bien tras la fijación con aldehído e incluso tras la permeabilización posterior con detergentes.

4.4 TAMPONES, AGENTES Y FÁRMACOS

- Los conjugados de Anexina V altamente fluorescentes proporcionan métodos de detección rápidos y fiables para el estudio de la externalización de la fosfatidilserina, uno de los primeros indicadores de apoptosis. El tinte Alexa Fluor 488 es un tinte verde fluorescente con unos espectros similares a los de la fluoresceína (FITC o isotiocianato de fluoresceína). Ioduro de propidio (PI) es ampliamente utilizado, en conjunción muchas veces con

la anexina V, para determinar si las células son viables, están en apoptosis o en necrosis. Esto se realiza observando las diferencias en la integridad de la membrana, del plasma y de la permeabilidad de la membrana. PI se utiliza con más frecuencia que otros marcadores nucleares porque es económico, estable y es un buen indicador de la viabilidad celular, debido a su capacidad de no penetración en las células vivas. La capacidad de PI para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana. PI marca las células apoptóticas en vivo, debido a la presencia de una membrana plasmática intacta.

- Sustrato de ECL, es un quimioluminiscente para la detección de la actividad de anticuerpos y otras sondas de inmunotransferencia (Western blot), suministrado por Pharmacia Biotechnology, (San Francisco, CA).
- EDTA y sus derivados, tienen la propiedad química de combinarse con iones metálicos polivalentes en solución para formar complejos coordinados cíclicos no-iónicos, solubles en agua y virtualmente no dissociables. A estos complejos se les conoce como quelatos. El cultivo de tejidos, usando EDTA, se utiliza como un agente quelante que se une a calcio y previene la unión de las caderinas

entre las células previniendo la agrupación celular en cultivos en suspensión y para separar las células adherentes durante los pases.

- EGTA, es un agente quelante útil para la determinación de calcio en presencia de magnesio.
- FITC fluoresceína-5-isotiocianato, (Fluorescein-IsoTioCyanate), es una molécula que pertenece al grupo de los colorantes de xanteno. Actúa como fluorocromo y es derivado de la fluoresceína. El anticuerpo marcado con un fluorocromo reacciona con el antígeno específico cuya presencia se quiere determinar y se observa el resultado de la reacción con un microscopio de fluorescencia.
- GFP, es una proteína verde fluorescente, se comporta como una señal luminosa capaz de expresarse en células mediante las técnicas rutinarias de transgénesis. Al llevar la fluorescencia incorporada en su estructura, la bioluminiscencia de la GFP puede producirse y mantenerse espontáneamente en aquellas células vivas que incluyan el gen que la codifica, sin necesidad de añadir otros agentes o cromóforos. Su código genético puede fusionarse a otras proteínas, proporcionando a éstas un dominio fluorescente extra a modo de marca o

etiqueta luminosa, que sirve para poder seguir su actividad in vivo, seleccionar y aislar aquellas células que producen la proteína fusionada a GFP o cuantificar la cantidad de dicha proteína producida en un momento dado.

- HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanesulfonic), es un compuesto orgánico de naturaleza de Zwitterión y es también un tampón. Empleado con mucha frecuencia en los cultivos celulares, debido a que se ha demostrado que es un buen controlador del pH fisiológico. Tiene como ventaja frente a otros tampones, como los tampones de carbonato, que además evita los cambios debidos a la liberación de dióxido de carbono producido por el crecimiento celular.
- PBS (tampón o buffer fosfato salino), es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Es isotónico y no es tóxico para las células. Se usa para diluir sustancias utilizadas para el cultivo y para lavar los recipientes que contienen las células. No modifica el perfil de expresión y funcionamiento de la célula normal. El uso de esta solución es muy común para lavar células a través de centrifugación.

- Rodamina, es un compuesto orgánico heterocíclico fluorescente, basado en el xanteno. Puede considerarse derivado de la fluoresceína. Se utiliza para la tinción de mitocondrias.
- TBS, se utiliza a menudo en inmunotransferencia, tanto para el lavado de la membrana como para la dilución del anticuerpo primario o secundario.
- TBST (TBS + Tween 20), es un tampón salino utilizado en el Western Blot.
- El tensoactivo no iónico Tritón-X 100, es un compuesto químico que tiene muchas aplicaciones en diversas disciplinas. Como agente humectante en los laboratorios de histología y microscopía o también se emplea en disolución diluída para humectar durante algunos protocolos de tinción.
- La ranolazina (Rn) se obtuvo de Sigma Aldrich biotechnology y disuelta en tampón de Krebs a la adecuada concentración final (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M).

4.5 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

4.5.1 MICROSCOPIA CONFOCAL

El principio del funcionamiento de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera del foco, iluminando una pequeña zona de muestra. El microscopio consta de las siguientes partes:

- Dos diafragmas (pinhole), uno entre la fuente de la luz y el objetivo y otro entre el objetivo y el detector. Ambos se encuentran perfectamente alineados, de forma que solamente el segundo deja pasar la luz del plano focal al detector.
- Laser como fuente de luz que permite focalizar la iluminación en una región más pequeña de la muestra con gran intensidad.
- Sistema de barrido, beam scanning, donde la muestra se desplaza por la muesca o stage scanning sin que el haz se desplace y permanezca inmóvil.

Se logran imágenes en diferentes planos focales y es posible aplicar técnicas de reconstrucción 3D que permiten visualizar las estructuras. El microscopio utilizado en este trabajo ha sido el Laser Confocal Leica TCS SP2 de Leica Microsystems.

4.5.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En la técnica de inmunofluorescencia se utiliza un microscopio que consta de las siguientes partes:

- Fuente de luz ultravioleta y de luz visible.
- Uno o varios filtros de excitación o filtros primarios, que seleccionan la longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra.
- Filtro secundario o de barrera, que selecciona las longitudes de onda emitidas dentro del espectro visible, dejando pasar solo la luz emitida por la sustancia fluorescente e impidiendo el paso de la luz excitadora.

Las principales técnicas de inmunofluorescencia son el tipo directo y el indirecto:

- Técnica de inmunofluorescencia directa: se utiliza un anticuerpo (Ac) específico frente al antígeno (Ag) que se desea detectar, conjugado a un fluorocromo (elemento/compuesto de fluorescencia).
- Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI): se emplea en un primer paso el anticuerpo específico no marcado, y en un segundo paso un anticuerpo marcado con el correspondiente fluorocromo que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario. Es más sensible y

resulta muy útil para detectar, en el suero de pacientes, determinados tipos de anticuerpos que son capaces de reaccionar con antígenos presentes en los propios tejidos.

Otras técnicas de inmunofluorescencia (IF) son:

- La técnica sándwich, para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas ante un determinado antígeno en las células plasmáticas en tejidos de un animal previamente inmunizado con este antígeno.
- La técnica de incubación con complemento es una modificación de la técnica indirecta y en ella el anticuerpo que se emplea en el primer paso de la técnica ha de ser capaz de fijar el complemento.

El microscopio de fluorescencia utilizado en este trabajo fue un Diaphot 300 (Nikon®, Tokyo, Japan). Las células creciendo en monocapas y en cristales de 16-mm se usaron para estudios de inmunofluorescencia siguiendo el procedimiento descrito por Vallés y sus colaboradores (Vallés et al., 2008). Los anticuerpos monoclonales anti-MAP-2 y anti-GFAP se usaron para detectar la pureza de los cultivos y poder descartar entre presencia de neuronas y astrocitos. La incubación se realizó a 37°C durante 60 min. Después de diversos lavados con tampón fosfato salino (PBS), las células se incubaron con el anticuerpo secundario y cuando fue necesario, el núcleo se tiñó con (0.5

µg/ml) de tinción Hoechst 33342 durante 5 min. En otros experimentos, los astrocitos fueron incubados con mitotracker® y Hoechst 33342 y las neuronas simultáneamente con Anexina V, Hoechst 33342 y Rodamina para ver apoptosis y necrosis.

4.5.3 ENSAYO AZUL DE TRIPANO

El ensayo de exclusión de azul de tripano fue usado para contar las células vivas y monitorizar la proliferación celular. Los astrocitos fueron aislados y cultivados a una concentración de 7×10^4 células/35 mm placa. Después de 5 días de cultivo, las células fueron incubadas y la solución de azul tripano al 1.5% fue añadida a los cultivos de celulares a temperatura ambiente durante 3 min.

4.6 CULTIVOS PRIMARIOS

4.6.1 CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS

Para los cultivos primarios de neuronas corticales, se extrajeron cortezas cerebrales obtenidas en condiciones estériles. Posteriormente, se diseccionaron y disociaron mecánicamente mediante pipeteo durante 10 minutos con

DMEM (10 ml para la totalidad de los 14-15 fetos obtenidos a los 14-15 días fetal).

La suspensión celular se filtró a través de una malla de nilón de un poro de 90 μm de diámetro, eliminando capilares sanguíneos y agregados celulares. La suspensión celular se colocó en placas que previamente se habían revestido con la solución de poly-D-lisina (PDL) (5×10^4 células/ cm^2) para permitir la adhesión de las neuronas. Después de la adhesión de las células (1h), el medio se cambió a DMEM pH 7.4, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 10 mM HEPES, 40 mM NaHCO_3 , 100 unidades/ml penicilina, y 100 mg/ml estreptomicina. El cultivo de neuronas se dejó crecer en una atmosfera de 5% CO_2 y 95% aire, a 37°C, durante 3 días. Posteriormente, el cultivo se expuso al toxico citosina- β -D-arabinofuranosido-hidroclorido (10 μM), durante 24h, para prevenir la proliferación de células no neuronales, debido a que este tóxico es eficiente para destruir células en proliferación. Después se incubaron con $\text{A}\beta_{1-42}$ (péptido tóxico) y $\text{A}\beta_{40-1}$ (péptido control).

4.6.2 CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS

Los cultivos primarios de astrocitos corticales se llevaron a cabo a partir de cortezas cerebrales de fetos de 21-días de

gestación, bajo condiciones de esterilidad libres de toxinas y fueron diseccionadas y disociadas mecánicamente por pipeteo de 10 veces con DMEM (10 ml de medio para la totalidad de 12-14 fetos). La suspensión celular se filtró a través de una malla de nilón con un poro de 90 μm de tamaño.

Las células se colocaron en placas (5×10^4 células/cm²) con solución SBF a 20%, 10 mM HEPES (titration $\geq 99.5\%$), 40 mM NaHCO₃, 100 unidades/ml penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Después de 4 días, el medio se cambió por un medio nuevo preparado tal como se ha indicado anteriormente. A los 7 días de cultivo, el 20% de SBF se cambió a 10% de concentración.

Tanto los cultivos de astrocitos como de neuronas, crecieron en una atmosfera humidificada de 5% CO₂ y 95% aire, a 37°C, durante todo el tiempo de cultivo.

La posible contaminación de los astrocitos y de las neuronas fue determinada a través de ensayos de inmunofluorescencia (IF) utilizando el anticuerpo monoclonal anti-proteína ácida fibrilar de la glía (Anti-GFAP), marcador de astrocitos (1:500) y el anticuerpo (clone G-A-5) y el policlonal de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), marcador neuronal (1:500). Bajo estas condiciones aproximadamente el

99% \pm 3 de las células del cultivo eran neuronas y en el cultivo de astrocitos aproximadamente el 95% \pm 4 de las células eran astrocitos. Posteriormente se incubaron con A β ₁₋₄₂ (péptido tóxico) y A β ₄₀₋₁ (péptido control).

4.6.3 CULTIVO MIXTO ASTROCITOS Y NEURONAS

Para los cultivos mixtos de neuronas y astrocitos, se extrajeron cortezas cerebrales obtenidas en condiciones estériles. Posteriormente se diseccionaron y disociaron mecánicamente mediante pipeteo durante 10 minutos con DMEM (10 ml para la totalidad de los 14-15 fetos obtenidos a los 14-15 días fetal).

La suspensión celular se filtró a través de una malla de nilón de un poro de 90 μ m de diámetro, eliminando capilares sanguíneos y agregados celulares. La suspensión celular se colocó en placas que previamente se habían revestido con la solución de poly-D-lisina (PDL) (5×10^4 células/cm²) para permitir la adhesión de las neuronas.

Después de la adhesión de las células (1h), el medio se cambió a DMEM pH 7.4, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 10 mM HEPES, 40 mM NaHCO₃, 100 unidades/ml penicilina, y 100 mg/ml estreptomicina.

El cultivo de neuronas se dejó crecer en una atmosfera de 5% CO₂ y 95% aire, a 37°C, durante 3 días. Posteriormente, el cultivo no se expuso al toxico citosina-β-D-arabinofuranosido-hidroclorido por lo que la proliferación celular de astrocitos se permitió. Posteriormente se incubaron con Aβ₁₋₄₂ (péptido tóxico) y Aβ₄₀₋₁ (péptido control).

4.7 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo realizando ANOVA de una vía mediante el programa Graphpad Prim 5. Todos los resultados se expresaron como la media ± desviación estandard (DS). El t-test (Student's t) se usó para dos grupos de análisis. El test de Tukey se usó para el análisis de grupos múltiples. Los resultados se consideraron significativos con una $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 DIFERENCIAS ASTROCITOS Y NEURONAS

En las figuras 46 (a, b), 47 (a, b), 48 y 49 se muestran las diferencias existentes entre un cultivo de astrocitos y de neuronas, apreciándose la interconectividad mediante sus axones en las neuronas y la morfología característica de los astrocitos.

La imagen de neuronas se realizó en campo claro a 10 días de cultivo. La imagen de astrocitos se realizó con mitotracker (Fig. 46a) y Hoechst 33342 para teñir los núcleos (Fig. 46b), con campo claro (Fig. 47a) y con doble marcaje mitotracker y Hoechst 33342 (Fig. 47b). La figura 48 corresponde a neuronas en cultivo primario en imagen de campo claro. Inmunofluorescencia con el anticuerpo de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), específica de astrocitos, es mostrada en la figura 49 (Fig. 49).

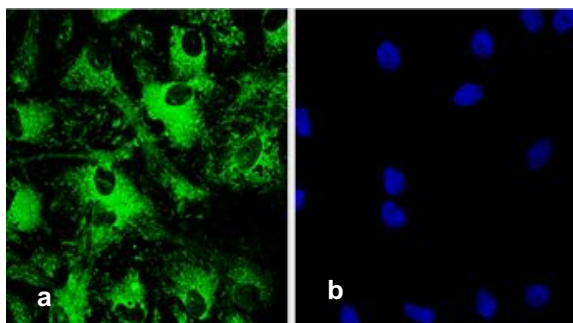


Figura 46 (a, b): Astrocitos. Mitotracker y Hoechst 33342

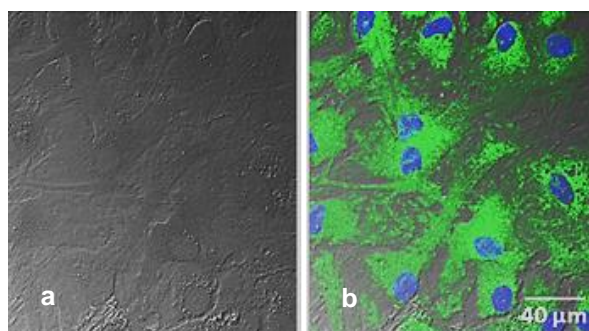


Figura 47 (a, b): Astrocitos de 10 días de desarrollo

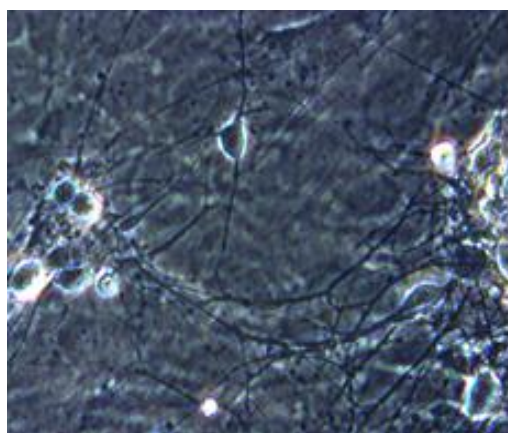


Figura 48: Neuronas en cultivo primario a 6 días de desarrollo

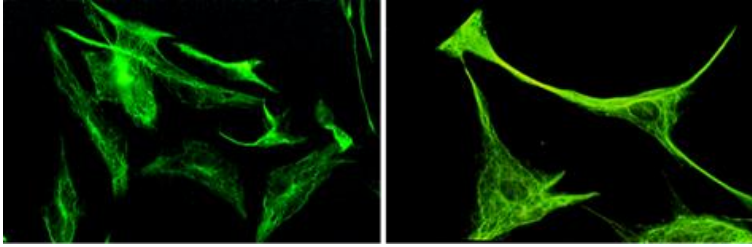


Figura 49: Astrocitos. Inmunofluorescencia GFAP + FITC (verde)

5.2 CULTIVO MIXTO NEURONAS Y ASTROCITOS

La figura 50 muestra un cultivo mixto de neuronas y astrocitos. En el panel arriba a la izquierda se han marcado las células con el anticuerpo anti-GFAP, característica de astrocitos.

En el panel arriba a la derecha se han marcado las células con anti-Map-2, marcando las neuronas. Abajo a la izquierda se ha utilizado Hoechst 33342, que tiñe núcleos y el panel de abajo a la derecha es una imagen de campo claro.

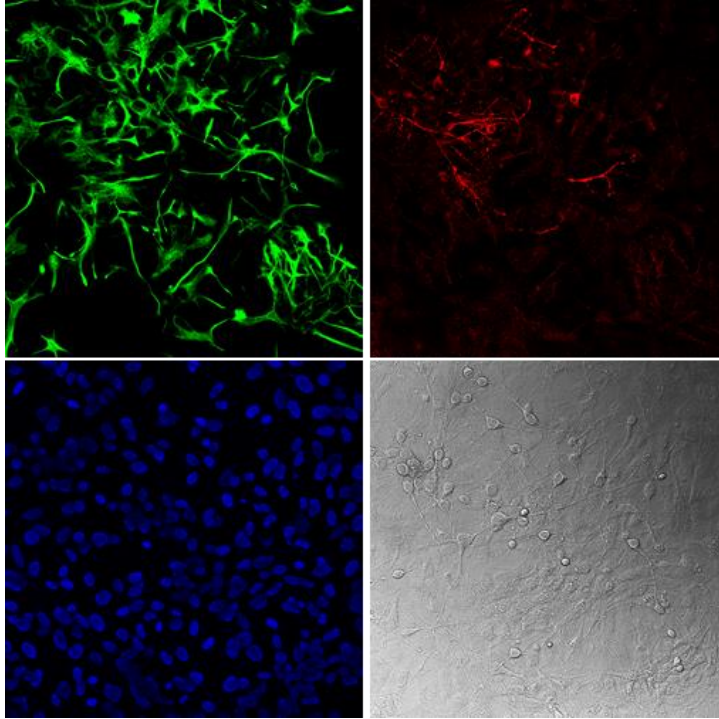


Figura 50: Cultivo mixto de neuronas y astrocitos

Panel superior izquierda: marcado con GFAP. Superior derecha: Map-2. Inferior izquierda: Hoechst 33342. Inferior derecha: campo claro

5.3 CICLO CELULAR Y MUERTE NEURONAL

Para determinar el ciclo celular y la muerte de neuronas en cultivo primario se realizaron ensayos de citometría de flujo. La figura 51 demuestra un aumento de la necrosis y la apoptosis tras la adición del péptido tóxico a las células en cultivo comparándolas con las células con A β ₄₀₋₁.

En la relación G0/G1 las células tratadas con A β ₁₋₄₂ presentaron una disminución significativa con respecto a las células control, lo que indica una disminución en entrada a la fase G1 o fase de crecimiento. En cambio, en la fase S, o de síntesis, no observamos diferencias significativas entre los dos grupos. En la figura 51, también podemos observar diferencias significativas entre control y células con péptido tóxico en la relación M/G2, donde las células control presentan un aumento significativo, indicando que las células dañadas con el péptido tóxico no entran en mitosis y posiblemente presenten una disminución de factores externos e internos que favorezcan la entrada en mitosis.

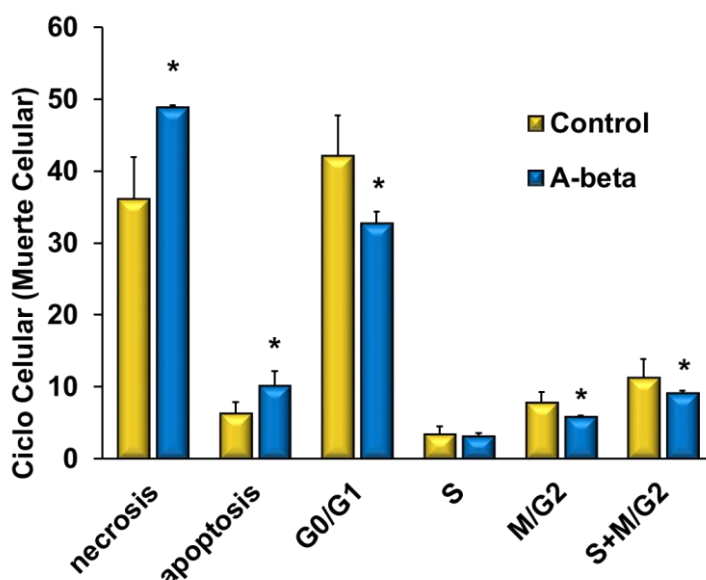


Figura 51: Neuronas en cultivo primario y ciclo celular

La necrosis, apoptosis y ciclo celular se determinó en neuronas tratadas con 5 μM $\text{A}\beta_{40-1}$ (control, C) o con 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ ($\text{A}\beta$) durante 24 horas. Los datos son la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control

5.4 PROTECCIÓN ASTROCITOS SOBRE NEURONAS

En una primera fase se evaluó la muerte celular inducida por $\text{A}\beta_{1-42}$ en cultivos de neuronas y/o astrocitos. Como se muestra en la figura 52, la incubación con 5 μM del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ durante 24 horas produjo una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente un 50% comparado con neuronas control ($\text{A}\beta_{40-1}$). Sin embargo, el tratamiento de los astrocitos con el péptido tóxico no indujo ningún cambio significativo en la

viabilidad celular comparada con astrocitos control no tratados. Además, cuando utilizamos cultivos mixtos de neuronas y astrocitos no se detectó muerte neuronal tras la incubación con el péptido tóxico comparado con las células control (Fig. 52).

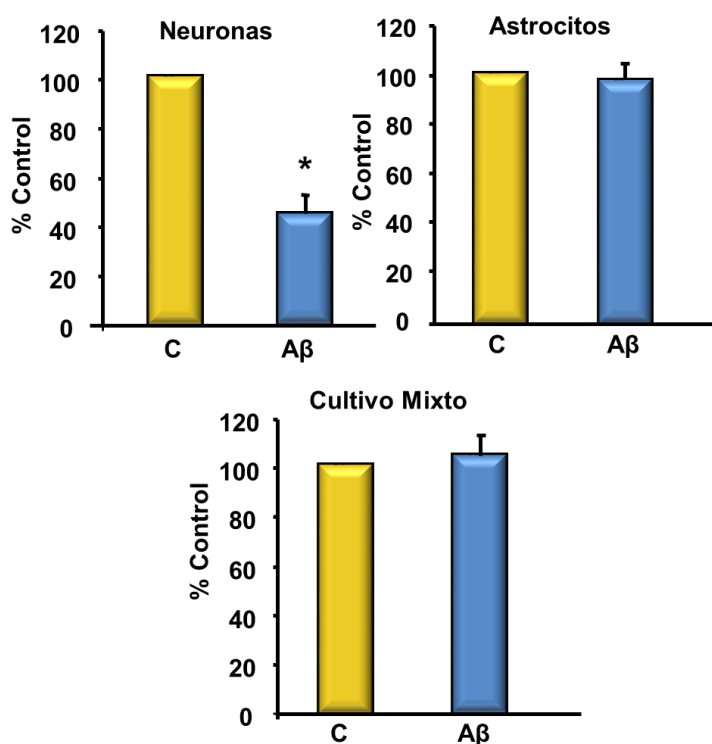


Figura 52: Viabilidad celular en neuronas y astrocitos

Viabilidad celular mediante MTT en neuronas con 5 μM A β_{40-1} (control, C) o con 5 μM A β_{1-42} (A β) durante 24 h. Los datos son la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

5.5 CASPASA 3 TRAS TRATAMIENTO CON A β ₁₋₄₂

Para analizar si los procesos apoptóticos intervenían en los cambios en la viabilidad celular, se evaluaron los efectos del tóxico de A β ₁₋₄₂ y del péptido control A β ₄₀₋₁ sobre la actividad de la Caspasa 3 en neuronas, astrocitos y en cultivo mixto. En la figura 53, se observa que la presencia del péptido tóxico aumenta de forma significativa ($p < 0.05$) la actividad de la Caspasa 3 respecto a las neuronas control. En el cultivo de astrocitos no se observaron cambios en la actividad de la Caspasa 3 si lo comparamos con los cultivos control de astrocitos, ni tampoco se detectaron cambios significativos en los cultivos mixtos de neuronas y astrocitos (Fig. 53).

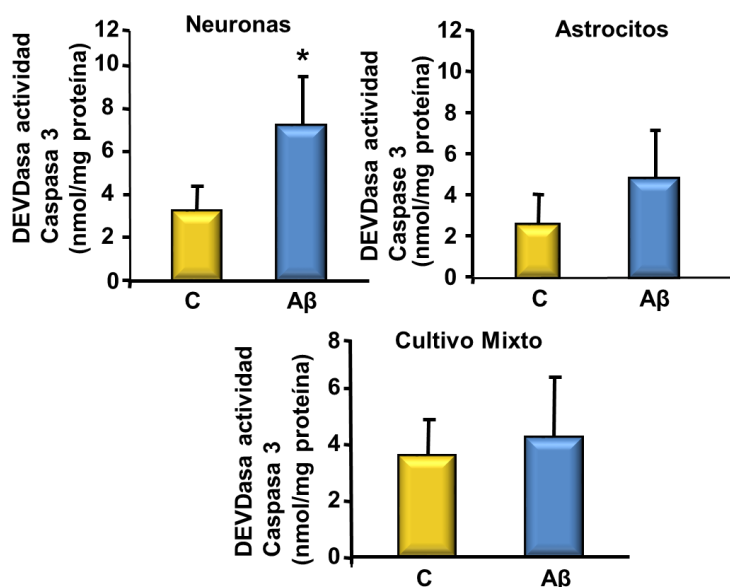


Figura 53: Ensayo de la actividad de la Caspasa 3

Actividad Caspasa 3 en células con 5 μ M A β_{40-1} , control o con el péptido tóxico A β_{1-42} en neuronas, astrocitos o en cultivo mixto (24 h). Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs control).

5.6 CITOCROMO C EN NEURONAS EN CULTIVO

Uno de los mecanismos mediados por receptor unido a la activación tardía de caspasas implica la disfunción mitocondrial, caracterizada por la liberación de Citocromo c y por la posterior activación de la Caspasa 9. Pudimos apreciar un aumento de la liberación de este citocromo en las células inducidas con el péptido tóxico si lo comparamos con el péptido control (Fig. 54).

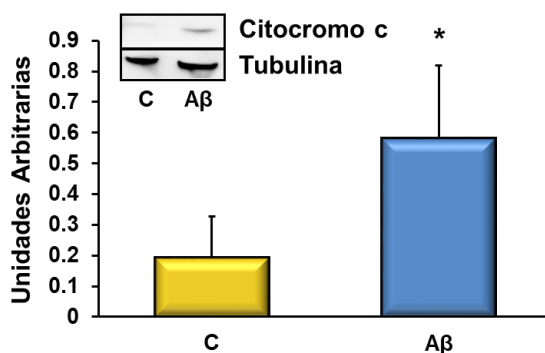


Figura 54: Proteína Citocromo c en neuronas

Neuronas con 5 μ M A β_{40-1} o con A β_{1-42} . Los datos son la media \pm DS de cinco experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs. Control).

5.7 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CÉLULAS CULTIVADAS

Para estudiar si la toxicidad del péptido A β_{1-42} se asociaba con el estrés oxidativo, se midieron los niveles de MDA (malondialdehído) como marcador de la peroxidación lipídica. La incubación con A β_{1-42} incrementó de forma significativa ($p < 0.05$) los niveles de MDA en los cultivos neuronales (Fig. 55). Sin embargo, el péptido tóxico no modificó los niveles de MDA ni en astrocitos ni en las células correspondientes a cultivo mixto. Solamente con concentraciones del péptido tóxico superiores a 20 μ M se detectaron aumentos significativos del MDA en astrocitos en cultivo primario.

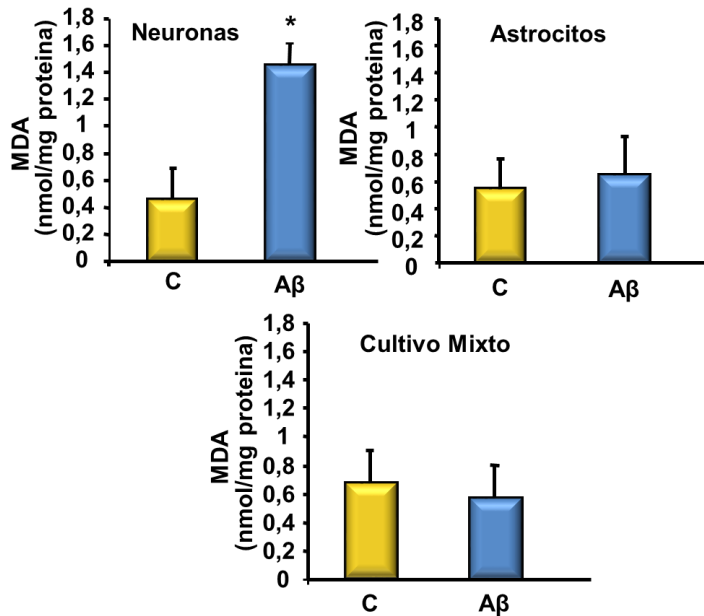


Figura 55: Niveles de MDA

Las células fueron tratadas durante 24 h con 5 μ M A β_{40-1} (control, C) o con 5 μ M A β_{1-42} (A β). Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos diferentes.
* $p < 0.05$ vs. Control.

5.8 BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN ASTROCITOS

La figura 56 muestra un aumento significativo de la biogénesis mitocondrial en los astrocitos incubados con el péptido tóxico si lo comparamos con los astrocitos control.

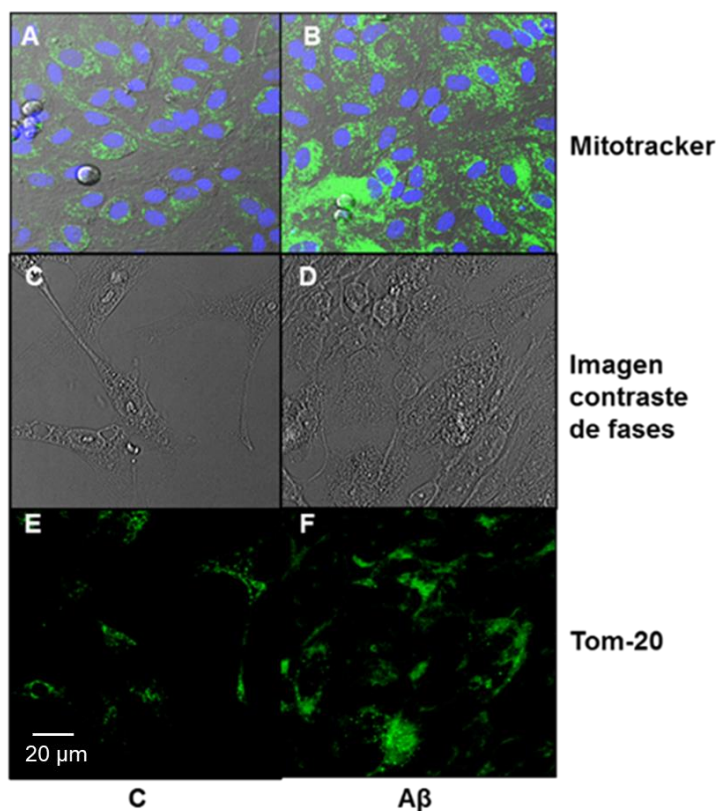


Figura 56: Agregación mitocondrial en astrocitos

Microscopia confocal en astrocitos en cultivo primario tratados durante 6 h con 5 μ M $A\beta_{40-1}$ (C) or 5 μ M $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$). Mitotracker (250 nM) para teñir mitocondrias y Hoechst 33342 (2 μ g/ml) para teñir los núcleos (A, B). Los paneles C y D muestran imágenes de contraste de fases. Imofluorescencia para detectar Tom 20 (E, F; 1:1000). La barra representa 20 μ m.

En el panel A observamos imágenes características de las mitocondrias en astrocitos en cultivo primario y en presencia del péptido control $A\beta_{40-1}$. En el panel B se aprecia un incremento en la biogénesis mitocondrial con imágenes más brillantes y compactas cuando se incubaba con el $A\beta_{1-42}$. En

ambos paneles la tinción en azul (Hoechst 33342) corresponde a los núcleos celulares. En los paneles C y D se incluyen las imágenes de contraste de fases en las células control e incubadas con el péptido tóxico respectivamente. En el panel E se muestra una imagen de inmunofluorescencia con el anticuerpo Tom-20 que evidencia la biogénesis mitocondrial en astrocitos incubados con el péptido control. En el panel F se observa la inmunofluorescencia con el mismo anticuerpo pero en las células incubadas con el péptido tóxico, siendo significativo el incremento en la biogénesis mitocondrial comparada con el panel control (Fig. 56).

5.9 NIVELES DE PERÓXIDOS EN ASTROCITOS

Con el objeto de determinar si los astrocitos en cultivo primario presentan estrés oxidativo se decidió determinar los niveles de peróxidos en astrocitos en cultivo primario. Para ello analizamos los niveles de peróxidos después de 24 h de incubación con el péptido tóxico $A\beta_{1-42}$ y se comparó con los niveles de peróxidos en los astrocitos con $A\beta_{40-1}$ sin la presencia del péptido tóxico $A\beta_{1-42}$ (Fig. 57). Los niveles de peróxidos se obtuvieron usando el protocolo que se indica en material y métodos de esta tesis.

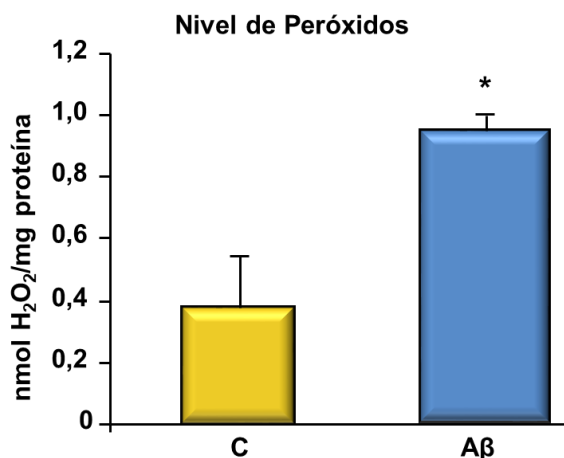


Figura 57: Aumento de niveles de peróxidos por Aβ

*En células tratadas durante 24 h con 5 μ M A β ₄₀₋₁ (C) o con 5 μ M A β ₁₋₄₂ (A β). Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos diferentes. * $p < 0.01$ vs. Control.*

Tras el ensayo fue evidente, y además detectado de manera significativa, que ocurría un aumento en los niveles de H₂O₂ en los astrocitos en cultivo primario incubados con el péptido tóxico si lo comparamos con los astrocitos en cultivo primario controles (Fig. 57). El valor aumentaba alrededor de tres veces más. El incremento de peróxidos de hidrógeno se correlaciona con un aumento de estrés oxidativo en las células astrocíticas en cultivo primario. El principal lugar de generación de peróxidos es la mitocondria. La vida media es de 1 milisegundo. Su medición es siempre indicada en la enfermedad de Alzheimer.

5.10 EXPRESIÓN DE MN-SOD EN ASTROCITOS

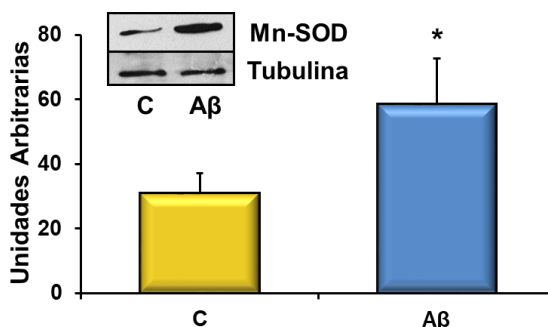


Figura 58: Expresión Mn-SOD por Aβ₁₋₄₂ en astrocitos

Mn-SOD se determinó células tratadas con 5 μ M Aβ₄₀₋₁ (C) o con 5 μ M Aβ₁₋₄₂ durante 24 h. Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

Se observó una hiperexpresión de la proteína Mn-SOD inducida por radicales libres de oxígeno en astrocitos en cultivo primario tras la aplicación del péptido tóxico versus control (Fig. 58), lo que demuestra génesis de estrés oxidativa debida al péptido tóxico.

5.11 EXPRESIÓN PROTEICA DE NF- κ B e I κ B

El estrés oxidativo inducido por la presencia del péptido tóxico provocó un aumento de la expresión nuclear del factor de transcripción p65 (NF- κ B) en astrocitos en cultivo primario

(Fig. 59). Por otra parte, se pudo observar un descenso en la expresión de la proteína I κ B en los citoplasmas astrocitarios tras la incubación con A β ₁₋₄₂ (Fig. 60). Las proteínas NF- κ B e I κ B se encuentran unidas en el citoplasma de la célula en condiciones control y al activarse por efecto de elementos tóxicos, como A β ₁₋₄₂, provocan la separación de las dos proteínas, incorporándose NF- κ B al núcleo y produciéndose la degradación de la proteína I κ B (Fig. 59 y 60).

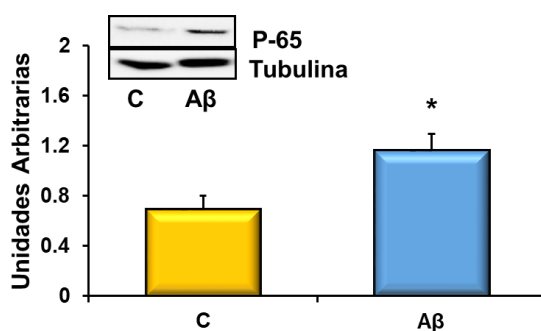


Figura 59: Expresión de p-65 (NF- κ B) por A β ₁₋₄₂

*La expresión de la proteínas p-65 en condiciones control (C) y después de la adición de 5 μ M del péptido tóxico A β ₁₋₄₂ durante 24 h (A β). Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * p < 0.05 vs. Control.*

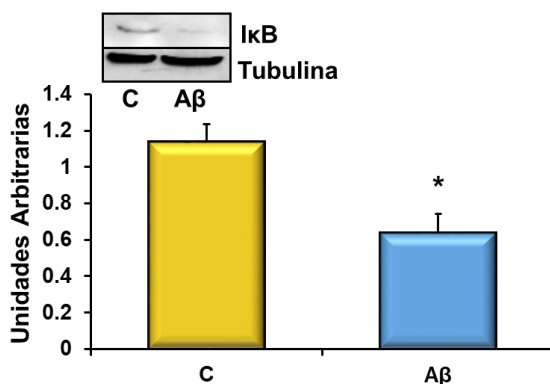


Figura 60: Expresión de la subunidad de IkB causada por Aβ₁₋₄₂

La expresión de la proteína IkB en condiciones control (C) y después de la adición de 5 μM del péptido tóxico Aβ₁₋₄₂ durante 24 h (Aβ). Los datos representan la media ± DS de cuatro experimentos independientes. *p < 0.05 vs. Control.

5.12 EXPRESIÓN PROTEICA DE LA PROTEÍNA TFAM

Debido a la existencia de biogénesis mitocondrial, determinamos los niveles de expresión de la proteína TFAM en ausencia (control) y en presencia de Aβ₁₋₄₂. El péptido tóxico ocasionó una sobreexpresión de la proteína TFAM en astrocitos en cultivo primario comparado con la expresión de esta proteína en las células control. Después de producirse estrés mitocondrial en las células, según nuestros datos, se ocasiona biogénesis mitocondrial relacionada con los cambios producidos en la expresión de la proteína TFAM (Fig. 61).

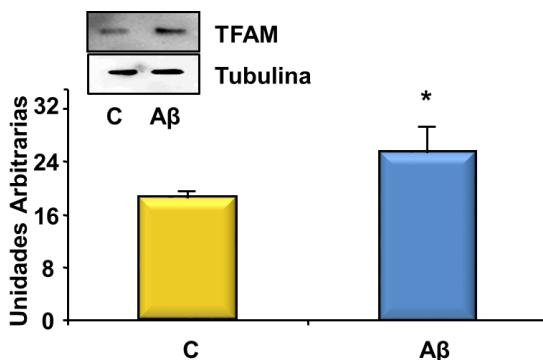


Figura 61: Expresión de TFAM en Astrocitos

Los Astrocitos fueron incubados con 5 μ M de $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$) o 5 μ M $A\beta_{40-1}$ (C) durante 24 h (western blot). Se muestra una imagen representativa en la gráfica. Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

5.13 EXPRESIÓN PROTEICA DE LA PROTEÍNA PGC-1

En la biogénesis mitocondrial también se puede producir un incremento de la proteína PGC-1, que activada pasa a PGC-1 fosforilada (P-PGC-1). Para conocer los posibles cambios en esta proteína, determinamos los niveles de expresión en ausencia (control) y en presencia de $A\beta_{1-42}$. El péptido tóxico ocasionó una sobreexpresión de la proteína PGC-1 en astrocitos en cultivo primario comparándolo con la expresión de dicha proteína en las células control. Por lo tanto, el estrés mitocondrial podría ocasionar biogénesis mitocondrial con aumento detectado en PGC-1 (Fig. 62).

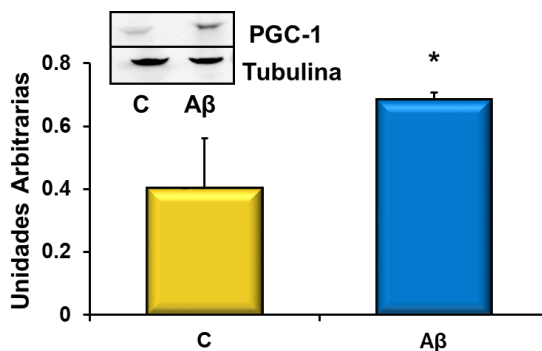


Figura 62: Expresión de PGC-1 en cultivos primarios de Astrocitos

Los Astrocitos fueron incubados con 5 μM de $\text{A}\beta_{1-42}$ ($\text{A}\beta$) o 5 μM $\text{A}\beta_{40-1}$ (C) durante 24 h para la determinación de la expresión proteica de PGC-1 por western blot. Se muestra una imagen representativa en la gráfica. Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

5.14 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PPAR- γ

La biogénesis mitocondrial se encuentra regulada por muchos tipos de proteínas, entre ellas la proteína PPAR- γ . La figura 63 muestra una disminución significativa de PPAR- γ . Esta proteína es una proteína de acción anti-inflamatoria y que se ha visto implicada en muchos procesos de esa índole en diversas enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios.

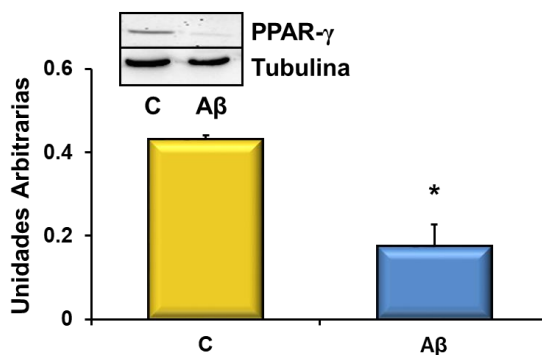


Figura 63: Expresión de PPAR- γ en cultivos primarios de Astrocitos

Los Astrocitos fueron incubados con 5 μ M de A β_{1-42} (A β) o 5 μ M A β_{40-1} (C) por 24 h para determinación por western blot. Se muestra una imagen representativa en la gráfica. Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

5.15 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA SIRT-1

Para determinar otra de las proteínas que se conoce que regula la biogénesis mitocondrial, se determinó la expresión proteica de SIRT-1 (Fig. 64). Dicha proteína presenta una disminución significativa de su expresión. SIRT-1 está involucrada en el envejecimiento y en el alargamiento de la vida mediante la menor ingesta de alimento.

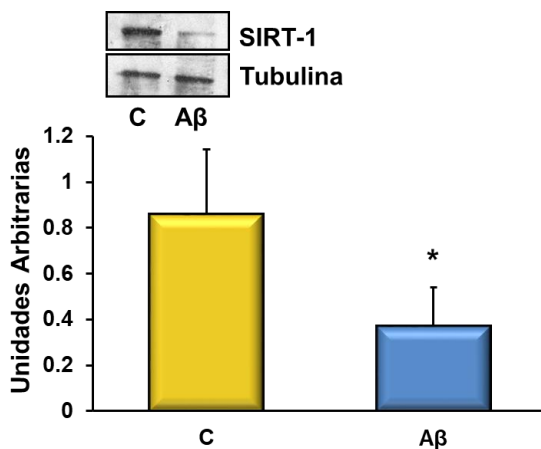


Figura 64: Expresión de SIRT-1 en Astrocitos en cultivo primario

Los Astrocitos fueron incubados con 5 μ M de $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$) o 5 μ M $A\beta_{40-1}$ (C) durante 24 h para la determinación de la expresión proteica por western blot. Se muestra una imagen representativa en la gráfica. Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

5.16 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p38 Y p-p38

Para determinar la expresión de las proteínas p38 y p-p38, se realizaron western-blot de las mismas (Fig. 65). P-p38 presenta, bajo nuestro estudio, un aumento significativo de su expresión. En cambio, p-38 no presentó cambios significativos en Astrocitos en cultivo primario. Está proteína está involucrada en la comunicación intercelular. Su expresión y salida al exterior, provoca la entrada al interior celular de la citoquinas pro-inflamatorias. Estas desarrollaran una serie de procesos como la producción de más citoquinas pro-inflamatorias y por

lo tanto el aumento o la disminución de la inflamación y el daño celular.

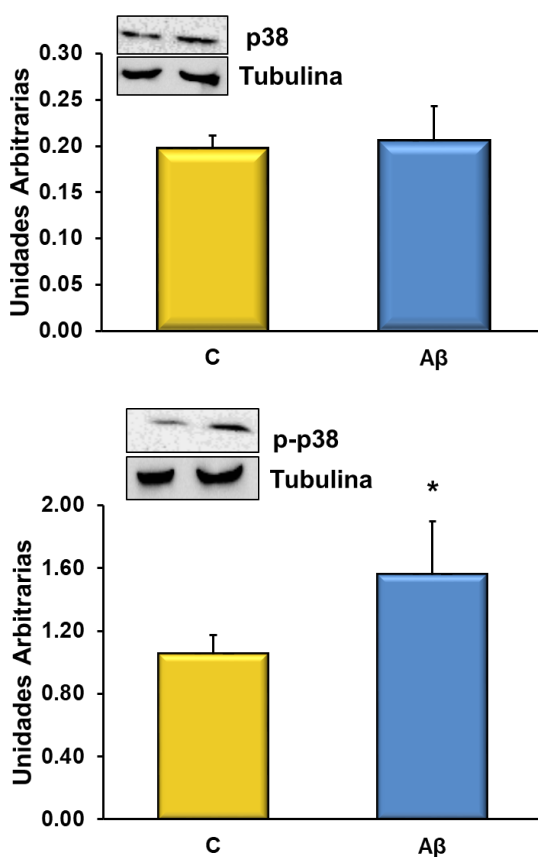
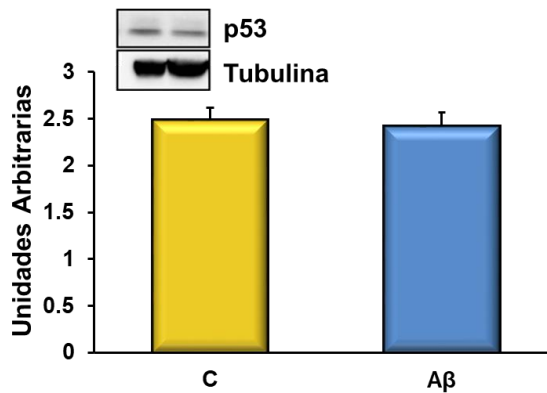


Figura 65: p38 y p-p38 en Astrocitos en cultivo primario

Los Astrocitos fueron incubados con 5 μ M de $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$) o 5 μ M $A\beta_{40-1}$ (C) durante 24 h para la determinación de la expresión proteica por western blot. Se muestra una imagen representativa en la gráfica. Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control.

5.17 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 y p-p53

Para determinar la respuesta al posible daño al ADN, analizamos la expresión de las proteínas p53 y p-p53, que detienen el ciclo celular en el caso de mutación. p53 es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en la apoptosis. En la figura 66, se aprecia un aumento significativo de la proteína p-p53 en los astrocitos incubados con 5 μ M de A β ₁₋₄₂ comparado con los astrocitos control.



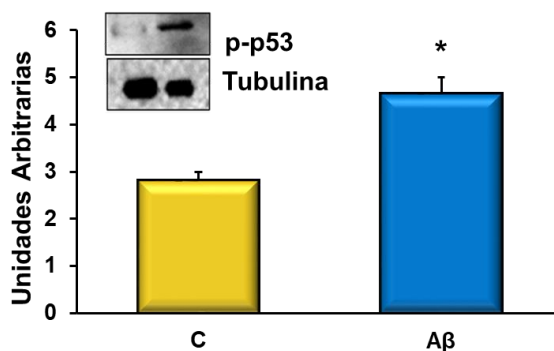


Figura 66: p53 y p-p53 en Astrocitos en cultivo primario

Los Astrocitos fueron incubados con 5 μ M de A β ₁₋₄₂ (A β) o 5 μ M A β ₄₀₋₁ (C) durante 24 h para la determinación de la expresión proteica por western blot. Se muestra una imagen representativa en la gráfica. Los datos representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. *p < 0.05 vs. Control.

5.18 RN Y ENSAYO EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPANO

El ensayo de exclusión de azul de tripano fue usado para contar las células vivas y monitorizar la proliferación celular. Los astrocitos fueron aislados y cultivados a 7×10^4 células/35mm de placa. Tras 5 días de cultivo, las células fueron incubadas sin (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24h. En condiciones de control la proliferación fue de 0.9% previa incubación con Rn. Tras la incubación con Rn, la proliferación se incrementó un 15% (10^{-7} M), 37% (10^{-6} M) y 39% (10^{-5} M) respectivamente.

	Células (x10 ⁴ /35 mm)	5 días de cultivo	Rn 24 h (x10 ⁴ /35 mm)	Proliferación (%)
Control	7	12.47 ± 0.21	12.58 ± 0.18	0.9
Rn 10 ⁻⁷ M	7	12.25 ± 0.32	14.09 ± 0.26 *	15
Rn 10 ⁻⁶ M	7	12.18 ± 0.45	16.69 ± 0.25 *	37
Rn 10 ⁻⁵ M	7	12.31 ± 0.51	17.11 ± 0.31 *	39

Tabla 5: Los astrocitos incubados a 7x10⁴ cells/35 mm

Se incubaron sin Rn (control, C) o con Rn (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M) por 24 h. El ensayo de exclusión de tripano azul se usó para el conteo de las células vivas y monitorizar la proliferación celular. Los datos representan la media ± SD de cuatro experimentos independientes (de 4 ratas diferentes). *p < 0.05 vs. Control.

5.19 RN Y ENSAYO MTT EN ASTROCITOS

El papel que la Rn juega en la viabilidad celular de los astrocitos en cultivo primario fue estudiado también usando el ensayo de MTT. La figura 67 nos muestra que la incubación con Rn a diferentes concentraciones (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M), indujo un incremento significativo en la viabilidad de los astrocitos a cualquier concentración estudiada (21% (10⁻⁷ M), 40% (10⁻⁶ M) y 43% (10⁻⁵ M)) comparándolas con las células control. Aβ₁₋₄₂ (15 μM) disminuyó significativamente la viabilidad celular en comparación con los astrocitos control (38%). La incubación

con Rn (10^{-6} M) y además el péptido tóxico, previno la disminución de la viabilidad celular inducida por $A\beta_{1-42}$.

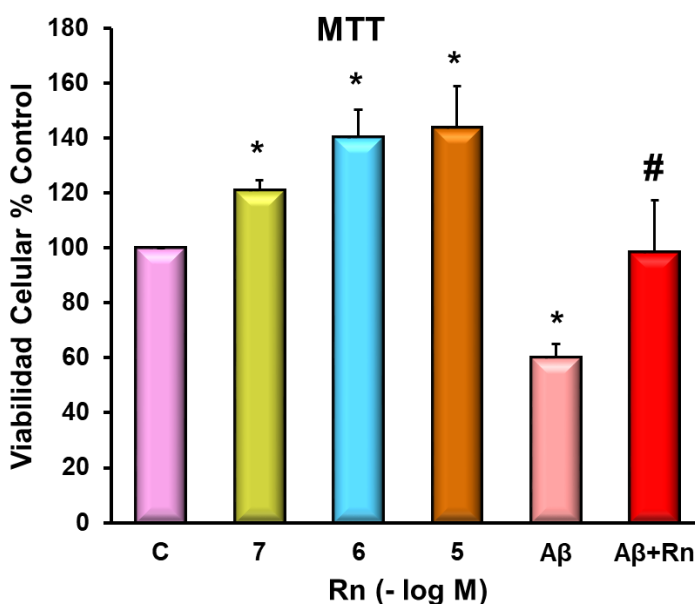


Figura 67: Viabilidad celular con Rn en astrocitos

Los astrocitos fueron incubados sin Rn (control, C), con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), con amiloide β_{1-42} ($15 \mu\text{M}$) o con amiloide β_{1-42} ($15 \mu\text{M}$) + Rn (10^{-6} M). Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.20 RN Y ENSAYO MTT EN NEURONAS

Las neuronas previamente incubadas con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24h, no mostraron diferencias significativas en

la viabilidad celular en comparación con las células control (Fig. 68).

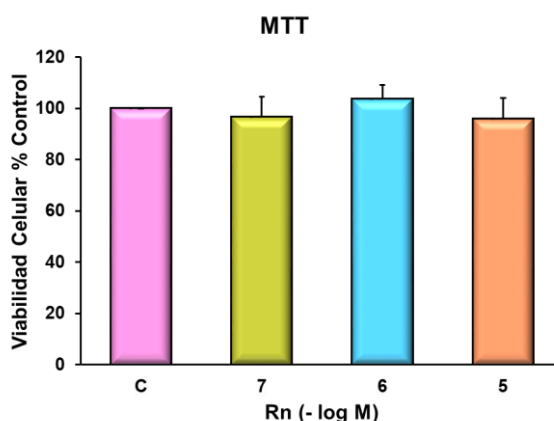


Figura 68: Viabilidad celular con Rn en neuronas

Las neuronas fueron incubadas sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M). Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes).

5.21 RN Y ENSAYO LDH EN ASTROCITOS

Para determinar los cambios en la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa, se incubaron los astrocitos con o sin ranolazina. La incubación de los astrocitos con Rn (10^{-6} M y 10^{-5} M) durante 24h, disminuyó la liberación al medio de LDH (15% con Rn 10^{-6} M y 20% con Rn 10^{-5} M) y previno además la fuga de LDH inducida por A β_{1-42} (15 μ M), indicando que los astrocitos están de alguna manera protegidos por la ranolazina

(Fig. 69). La LDH se produce en situaciones de necrosis, por lo que su aumento indica incremento del proceso de necrosis celular. Sustancias que disminuyan la liberación de LDH ayudan a disminuir la necrosis producida por algún tóxico. El péptido tóxico incrementó la liberación de LDH en un 75% aproximadamente y la incubación con Rn (10^{-6} M) redujo en un 60% los niveles de LDH, indicando un efecto protector claro en contra de la presencia en el medio de cultivo del péptido tóxico $A\beta_{1-42}$.

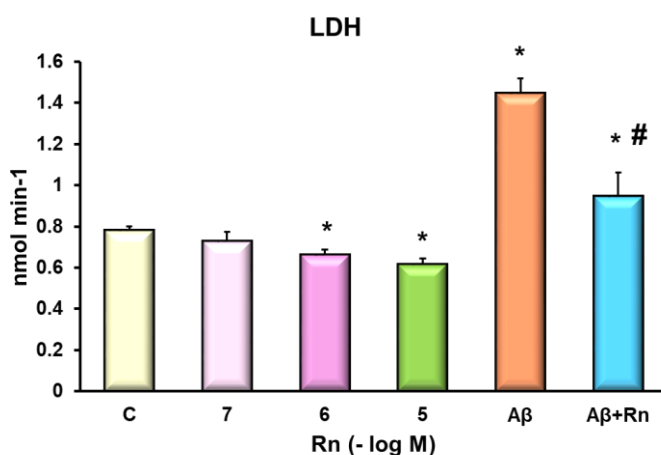


Figura 69: Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa

Los astrocitos fueron incubados sin Rn (control, C), con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), con amiloide β_{1-42} ($15 \mu\text{M}$) o con amiloide β_{1-42} ($15 \mu\text{M}$) + Rn (10^{-6} M) durante 24h. La actividad de lactato deshidrogenasa fue medida en sobrenadante de astrocitos. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes (tres ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs células control. # $p < 0.05$ vs células tratadas con $A\beta$.

5.22 CASPASA 3 EN ASTROCITOS CON Rn

La incubación con Rn (10^{-6} M y 10^{-5} M) durante 24h a astrocitos en cultivo primario, produjo una reducción de la actividad de la Caspasa 3 en un 25% (Rn 10^{-6} M) y en un 40% (Rn 10^{-5} M), comparando estos resultados con las células control incubadas sin Rn.

Con el péptido tóxico $A\beta_{1-42}$ (15 μ M) en el medio, la actividad de la Caspasa 3 se incrementó como se indica en la Figura 2. En el medio de cultivo $A\beta_{1-42}$ incrementó la actividad de Caspasa 3 un 105%.

Con el fin de saber la acción de la proteína Rn, se incubaron las células con el péptido tóxico y la proteína Rn. El aumento de la Caspasa 3 fue revertido por Rn en un 85%, indicando una reducción de la apoptosis tras la adición de Rn al cultivo (Fig. 70).

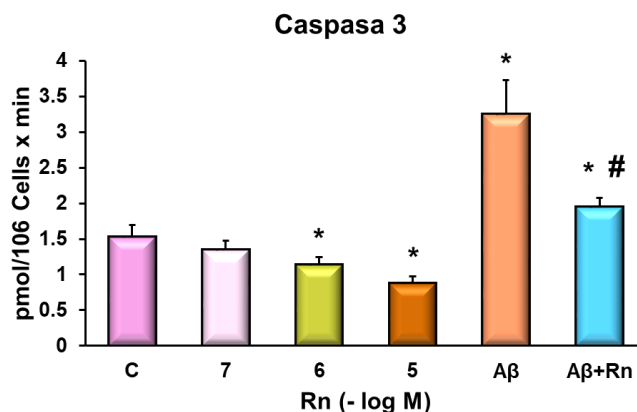


Figura 70: Actividad de la Caspasa 3

Los astrocitos fueron incubados sin Rn (control, C), con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), con amiloide β_{1-42} ($15 \mu\text{M}$) o con amiloide β_{1-42} ($15 \mu\text{M}$) + Rn (10^{-6} M) durante 24h. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (tres ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Células control. # $p < 0.05$ vs. Células tratadas con A β .

5.23 EXPRESIÓN DE SMAC/DIABLO CON RN EN ASTROCITOS

La figura 71 muestra la expresión de la proteína Smac/Diablo en astrocitos en cultivo primario. En astrocitos, la Rn disminuyó la expresión de Smac/Diablo (4.4-veces a 10^{-6} M y 7.6-veces a 10^{-5} M) (Fig. 71). La proteína Smac/Diablo se expresa cuando hay apoptosis inducida por daño celular ante tóxicos, por ejemplo.

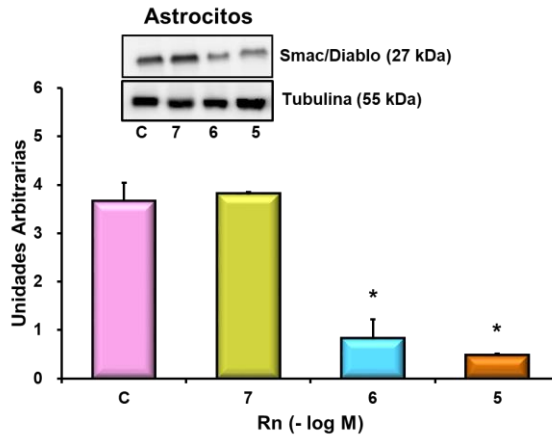


Figura 71: Expresión proteica de Smac/Diablo en astrocytes

Los astrocytes fueron incubadas sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h. Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de arriba. Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.24 EXPRESIÓN DE SMAC/DIABLO CON RN EN NEURONAS

En neuronas en cultivo primario, la proteína Smac/Diablo no presentó ninguna diferencia significativa comparando células control con células a diferentes concentraciones (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) (Fig. 72).

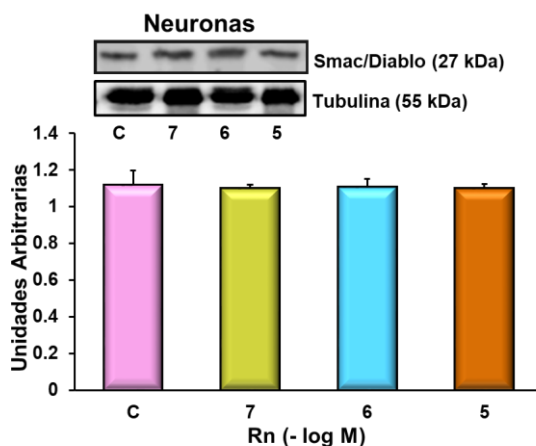


Figura 72: Expresión proteica de Smac/Diablo en neuronas

Las neuronas fueron incubadas sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h. Un inmunoblot se representa en la parte superior de la gráfica. Los datos constituyen la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.25 MEDICIÓN DE IL-1 β EN ASTROCITOS CON RN

El cultivo de astrocitos fue incubado con Rn a diferentes concentraciones (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M). La secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β fue detectada por ELISA de los sobrenadantes de las células cultivadas.

La citoquina es una proteína pro-inflamatoria que es liberada por la célula para comunicar a las vecinas y cercanas del incremento de inflamación en la zona. En el caso de

presencia de esta citoquina en sangre indicaría un aumento de inflamación a nivel sistémico. La figura 27 muestra que, en astrocitos, Rn disminuyó 3.65, 4.14 y 4.23-veces la liberación de IL-1 β a 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M respectivamente, comparado con los valores control (Fig. 73). Esto significaría que la Ranolazina puede regular el proceso inflamatorio favoreciendo la disminución del proceso en los astrocitos en cultivo primario.

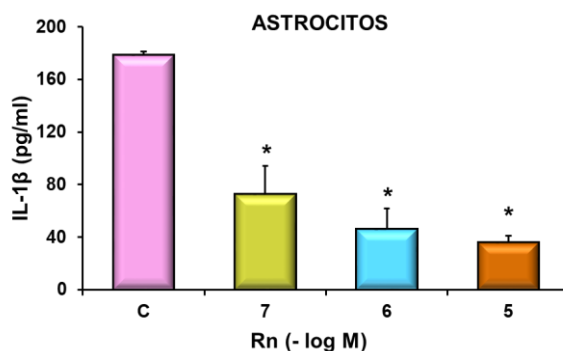


Figura 73: Determinación de la citoquina IL-1 β en astrocitos

Los Astrocitos fueron incubados sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) y obtenidos los sobrenadantes de los cultivos. La secreción de IL-1 β fue determinada por ELISA. Los valores representan la media \pm SD de experimentos replicados de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.26 MEDICIÓN DE IL-1 β EN NEURONAS CON RN

Se crecieron células neuronales control y con Rn a diferentes concentraciones (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M). Se recolectó

el medio de cultivo y se analizó la liberación de IL-1 β al medio. La molécula Rn no produjo cambios en la liberación de IL-1 β en neuronas a ninguna concentración analizada (Fig. 74).

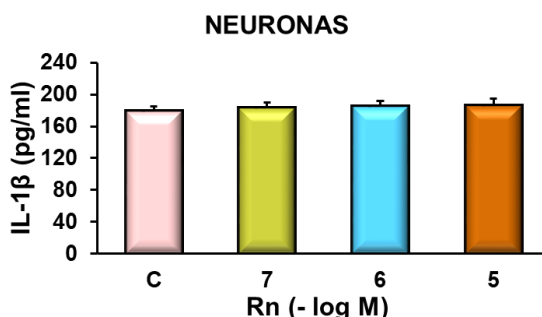


Figura 74: Determinación de la citoquina IL-1 β en neuronas

Las Neuronas fueron incubadas sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) y los sobrenadantes fueron obtenidos. La secreción de IL-1 β fue determinada por ELISA. Los valores representan la media \pm SD de experimentos de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes).

5.27 MEDICIÓN DE TNF- α EN ASTROCITOS CON RN

Los niveles de TNF- α fueron detectados por ELISA. La figura 75 muestra los efectos provocados por la proteína Rn (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) en astrocitos en cultivo primario. En astrocitos, Rn disminuyó 2.87, 4.21 y 6.63-veces la liberación de TNF- α a 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M respectivamente, comparado con las células control (Fig. 75).

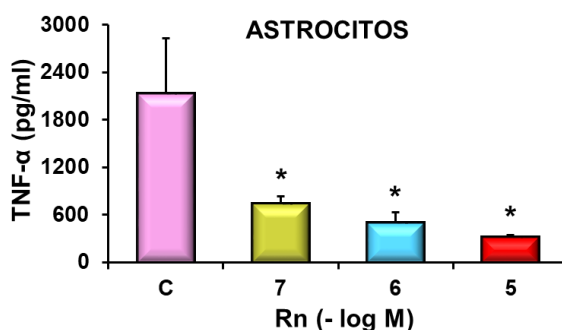


Figura 75: Determinación de la citoquina TNF-α en astrocitos

Los Astrocitos fueron incubados sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) y los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron recolectados. La secreción de TNF-α fue determinada por ELISA. Los valores representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.28 MEDICIÓN DE TNF-α EN NEURONAS CON RN

La figura 76 muestra los efectos provocados por la proteína Rn (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) en neuronas en cultivo primario. Se recolectó el medio de cultivo y se analizó la liberación de TNF-α al medio de cultivo. La molécula Rn no produjo cambios en la liberación de TNF-α en neuronas cultivadas a ninguna concentración analizada (Fig. 76).

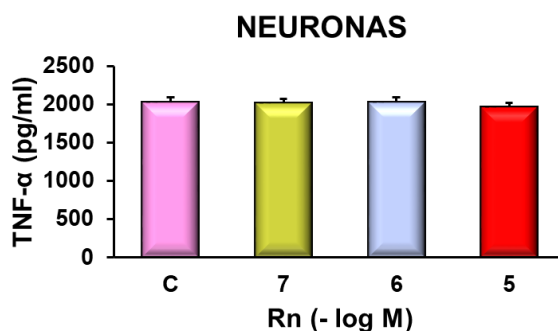


Figura 76: Determinación de la citoquina TNF-α en neuronas

Las Neuronas fueron incubadas sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) y los sobrenadantes de cultivos celulares fueron recolectados. La secreción de TNF-α fue determinada por ELISA. Los valores representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes).

5.29 RN Y EXPRESIÓN DE PPAR-γ EN ASTROCITOS

La familia de las proteínas PPARs regula negativamente la expresión génica de las proteínas pro-inflamatorias. La figura 77 muestra la expresión de PPAR-γ en cultivo de astrocitos. La proteína Rn incrementó la expresión de PPAR-γ en astrocitos en cultivo primario en 2.72-veces a 10^{-6} M y 2.84-veces a 10^{-5} M comparado con las células control (Fig. 77).

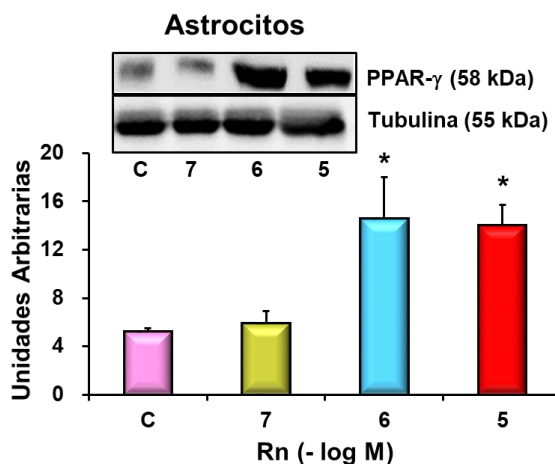


Figura 77: Expresión de la proteica de PPAR- γ en astroцитos

Los Astroцитos fueron incubados sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h y recolectados para determinar la expresi3n de la prote3na PPAR- γ mediante western blot. Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gr3fica. Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.30 RN Y EXPRESI3N DE PPAR- γ EN NEURONAS

La prote3na PPAR- γ es un mediador anti-inflamatorio que se expresa como respuesta al incremento de la inflamaci3n en procesos de respuesta celular ante da3o. La figura 78 muestra la expresi3n de PPAR- γ neuronas en cultivo primario.

Despu3s de la incubaci3n con la prote3na Rn no se detect3 ning3n cambio en la expresi3n de PPAR- γ a ninguna concentraci3n analizada comparada con los controles (Fig. 78).

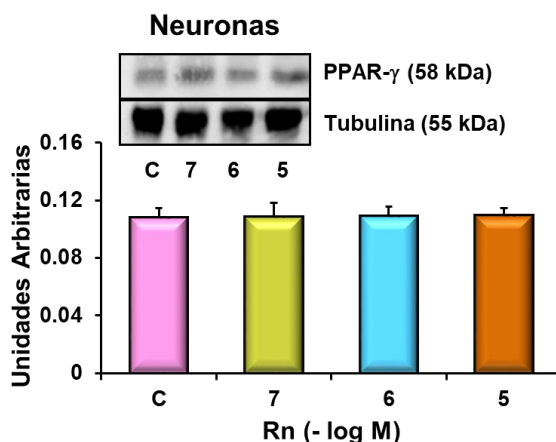


Figura 78: Expresión proteica de PPAR- γ en neuronas

Las Neuronas fueron incubados sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h y recolectados para determinar la expresión proteica de PPAR- γ mediante western blot. Un inmunoblot se muestra en la gráfica. Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes).

5.31 RN Y CU/ZN-SOD EN ASTROCITOS

La proteína Cu/Zn-SOD se encuentra en el citoplasma celular y su expresión indica un aumento del cambio de anión superóxido a H_2O_2 . Por lo tanto, la disminución en la peligrosidad de este anión superóxido es muy importante para disminuir el efecto de estrés oxidativo ocasionado por este radical libre. La enzima aumenta la cantidad de H_2O_2 que de todas maneras sigue siendo una molécula que también se considera un radical libre y que aumenta el estrés oxidativo.

La figura 79 muestra la expresión de la proteína Cu/Zn-SOD en astrocitos en cultivo primario. En astrocitos, Rn aumentó la expresión de Cu/Zn-SOD 4.49-veces a 10^{-6} M y 4.47- veces a 10^{-5} M comparada con las células control (Fig. 79). Esto indicaría un aumento de la defensa anti-oxidante ante la presencia de la proteína Rn.

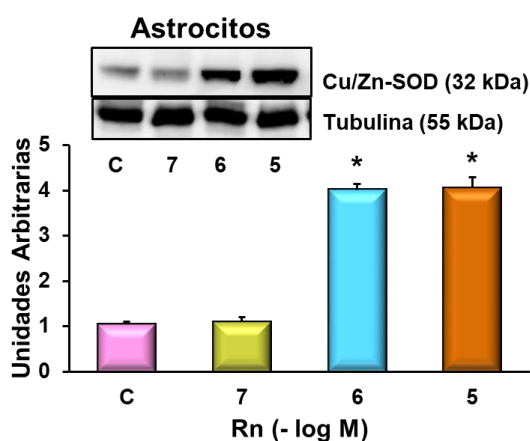


Figura 79: Expresión de la proteína Cu/Zn-SOD en astrocitos

Los Astrocitos fueron incubados sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h. Un inmunoblot representativo de Cu/Zn-SOD se indica en la gráfica.

Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.32 RN Y CU/ZN-SOD EN NEURONAS

La Proteína Cu/Zn-SOD no presentó cambios significativos respecto a control en cultivo primario de neuronas, a ninguna concentración analizada (Fig. 80).

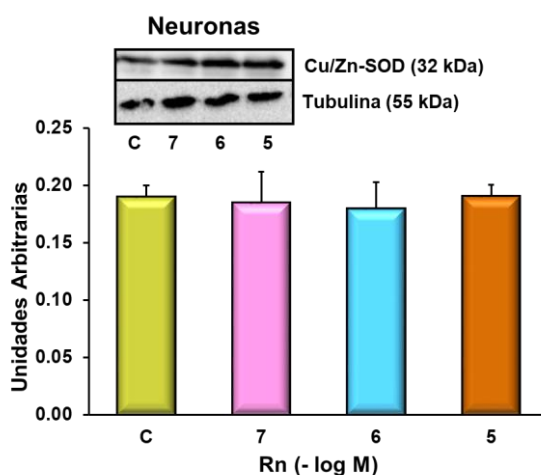


Figura 80: Expresión proteica de la proteína Cu/Zn-SOD en neuronas

Las Neuronas fueron incubadas sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h y recolectadas para determinar la expresión proteica de la Cu/Zn-SOD mediante western blot. Un inmunoblot representativo se muestra en la gráfica superior. Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes).

5.33 RN Y MN-SOD EN ASTROCITOS

La figura 81 muestra la expresión de la proteína Mn-SOD en astrocitos en cultivo primario. La enzima se expresa en la

mitocondria y no en el citoplasma como lo hacía la enzima Cu/Zn-SOD.

La expresión de dicha proteína a diferentes concentraciones de Rn (10^{-6} , 10^{-5} M) incrementó la expresión de Mn-SOD 4.12-veces y 4.20-veces respectivamente comparado con las células control. A 10^{-7} M de Rn no se observaron diferencias significativas con respecto a los valores control (Fig. 81).

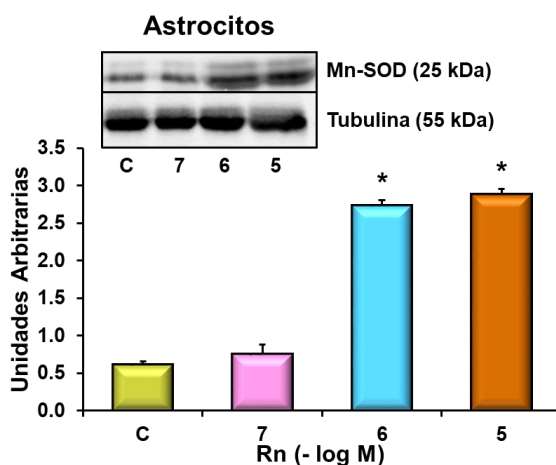


Figura 81: Expresión proteica de Mn-SOD en astrocitos

Los Astrocitos fueron incubados sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h y recolectados para determinar la expresión proteica de Mn-SOD mediante western blot. Un inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes). * $p < 0.05$ vs. Control.

5.34 RN Y EXPRESIÓN DE MN-SOD EN NEURONAS

La expresión de la proteína Rn en neuronas no produjo ninguna diferencia significativa en la proteína Mn-SOD comparada con las células control a ninguna concentración analizada (Fig. 82).

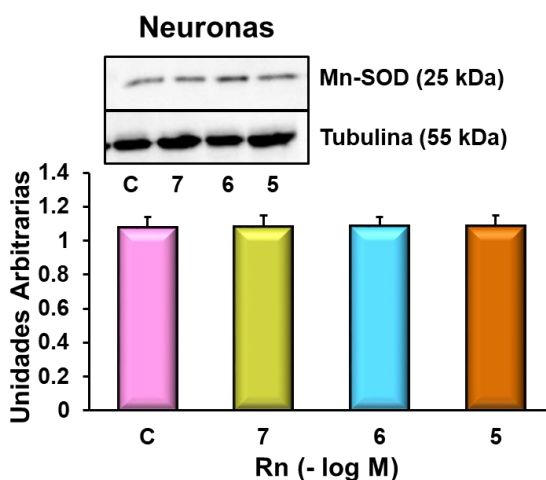


Figura 82: Expresión proteica de Mn-SOD en astrocitos

Las Neuronas fueron incubadas sin Rn (control, C) o con Rn (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) durante 24 h y recolectadas para determinar la expresión proteica de Mn-SOD mediante western blot. Un inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos independientes (cuatro ratas diferentes).

6.DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que el péptido tóxico (5 μ M $A\beta_{1-42}$) disminuye la viabilidad celular, aumenta la apoptosis y la peroxidación lipídica en neuronas en cultivo primario, pero no produce cambios ni en astrocitos ni en neuronas en cultivo mixto. Estos resultados indican un papel protector de los astrocitos sobre las neuronas frente a la toxicidad del péptido $A\beta_{1-42}$. Nuestro estudio también demuestra que en los astrocitos se produce un aumento de la biogénesis mitocondrial y de la expresión de la proteína Mn-SOD. Ambos mecanismos podrían contribuir al papel protector de los astrocitos sobre las neuronas. La relación existente entre neuronas y astrocitos es fundamental para entender los procesos de desarrollo cerebral y/o los de neurodegeneración. En el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer aparecen incrementados tanto los procesos inflamatorios como los de estrés oxidativo (Cole et al., 2004), pero el significado patológico de estos procesos permanece por dilucidar. Durante los últimos años se ha demostrado que la inflamación y el estrés oxidativo son mecanismos claves en la progresión de diversas patologías neurodegenerativas, entre ellas el Alzheimer (Eikelenboom and van Gool, 2004; Zhu et al., 2004; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013). Dado que la terapia antiinflamatoria protege a las

neuronas frente a diferentes tóxicos (McGeer, et al., 2006), la disminución tanto de los procesos inflamatorios como de estrés oxidativo podría mejorar la neurodegeneración observada en la enfermedad de Alzheimer.

Desde casi los inicios del descubrimiento de los astrocitos se conoce que realizan funciones nutricionales y de soporte neuronal y además, desde hace unas décadas, se han descubierto funciones de protección neuronal frente al estrés oxidativo y la inflamación (Skaper, 2007; Wyss-Coray, 2006). Estos efectos protectores pueden llegar a ser nocivos cuando se produce un aumento excesivo de la activación astrocitaria (Griffin et al., 1998). Cuando los astrocitos se activan en respuesta a ciertas patologías del SNC, como la enfermedad de Alzheimer, aumentan de tamaño y modifican su forma, presentando prolongaciones más gruesas, aumentando el número de mitocondrias, lisosomas y la actividad del retículo endoplasmático (Aguilhon et al., 2008; Guillamón-Vivancos et al., 2015). En estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación, se observó mediante inmunofluorescencia un aumento de la agregación mitocondrial (Vallés et al., 2008) en las neuronas afectadas por la adición del péptido tóxico A β ₁₋₄₂. En las imágenes obtenidas de astrocitos y neuronas realizadas para esta tesis, se observó un aumento de la agregación mitocondrial de las células

astrocíticas en comparación con las imágenes obtenidas en neuronas en cultivo primario. Esto se observó al incubar los astrocitos con 5 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ durante 24 horas, sugiriendo una alteración en la dinámica mitocondrial, con aumento de la producción de mediadores inflamatorios, de especies reactivas de oxígeno (Mrak and Griffin., 2005) y de los niveles de estrés oxidativo (Yan et al., 2013). Esto nos llevó a la hipótesis de que lo que ocurría en los astrocitos era un aumento del número de mitocondrias cuando los astrocitos se volvían reactivos. Además, se producían cambios en la dinámica mitocondrial, que así mismo inducían a un aumento en la producción de mediadores inflamatorios, en las especies reactivas de oxígeno (Mrak and Griffin., 2005) y en los niveles de estrés oxidativo (Yan et al., 2013). Cabe destacar que dependiendo del daño en el tiempo y en el espacio (cantidad de células dañadas) este daño puede ser revertido, ya que en una primera fase del proceso inflamatorio se producen mediadores proinflamatorios que participan en la protección del tejido, al limitar la supervivencia y la proliferación de agentes tóxicos que en última instancia producirán disminución del daño neural (Allan and Rothwell, 2001; Allan and Rothwell, 2003). Por el contrario, si la reacción no se detiene, se producirá una segunda fase donde la respuesta inflamatoria prolongada y exacerbada podría contribuir a una progresión del daño y aumento de la muerte celular presentes en la patología del Alzheimer y en

otras enfermedades neurodegenerativas (Wyss-Coray and Muckie, 2002; Strohmeyer and Rogers, 2001).

Nuestros resultados también muestran que el péptido tóxico aumenta significativamente los niveles de MDA en neuronas en cultivo primario, sin observarse cambios en los astrocitos en cultivo primario ni en ambas células en cultivo mixto. Ya que el MDA es un indicador de la peroxidación lipídica, una reducción en sus niveles en los cultivos mixtos es compatible con el efecto protector de los astrocitos impidiendo la lipoperoxidación neuronal debida al péptido tóxico. La presencia de los astrocitos en los cultivos mixtos puede proteger a las neuronas de la inflamación y del estrés oxidativo causado por el péptido $A\beta_{1-42}$, como ya ha sido descrito para otros componentes tóxicos (Lööv et al., 2012). Carrero y col. sugieren que la conversión a astrocitos reactivos podría estar mediada por la expresión de genes pro-inflamatorios y por el aumento de NF- κ B (sobre-expresado en inflamación) (Wallace et al., 1997), que aceleraría la muerte neuronal. Además, en su estudio estos autores indican que el péptido toxico provoca daño afectando a las neuronas, los astrocitos y a los vasos sanguíneos (Carrero et al., 2012). Las diferencias entre el estudio de Carrero y col. y nuestro trabajo podrían atribuirse a diferencias metodológicas. Nuestros experimentos, llevados a cabo en cultivos celulares, nos permiten estudiar los efectos del

péptido tóxico selectivamente en neuronas, astrocitos o cultivos mixtos. De esta manera, pudimos evaluar si el daño neuronal es causado por un efecto directo del péptido A β ₁₋₄₂ o por la inflamación generada en otras células. Además, el aumento de la expresión de la proteína p-65 (NF- κ B) que observamos en astrocitos podría no ser indicativo de la muerte neuronal, sino que sería compatible con un mecanismo protector hacia las neuronas, a través de un aumento en la fosforilación de PGC-1 que conduciría al incremento de los niveles de la proteína TFAM y por ende a la biogénesis mitocondrial como se discutirá más adelante.

Aunque existen evidencias de que la inflamación está implicada en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, algunos mediadores inflamatorios podrían mejorar la evolución de la enfermedad (Wyss-Coray, 2006). Wyss-Corey y col. demostraron la capacidad fagocítica de los astrocitos para eliminar y destruir el péptido tóxico, poniendo en evidencia el papel de estas células como defensa celular cerebral (Wyss-Coray, 2006). También, se han demostrado efectos anti-inflamatorios y protectores en los astrocitos expuestos al péptido tóxico, gracias a la acción de la genisteína y el estradiol (Vallés et al., 2010).

En el cultivo de astrocitos el A β ₁₋₄₂ produce un aumento de la expresión de Mn-SOD, lo que sugiere un posible sistema de defensa antioxidante que podría proteger a las neuronas frente al estrés oxidativo, tal como se ha demostrado que ocurre en el interior del cerebro (Zhu et al., 2007a). Nuestros resultados indican que los astrocitos protegen a las neuronas probablemente debido a un aumento de la biogénesis mitocondrial, consiguiendo una protección mejorada contra el estrés oxidativo y quizás iniciando procesos de control de la inflamación celular. El aumento de especies reactivas de oxígeno se encuentra involucrado con el daño al ADN mitocondrial (Bozner et al., 1997). Actualmente se conoce sobradamente que la proteína TFAM induce replicación y mantenimiento del ADN mitocondrial (Kang et al., 2007; Pappolla et al., 1998). En cultivo de células SH-SY5Y la sobre-expresión de la proteína TFAM disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno y atenúa el daño inducido por el péptido A β ₁₋₄₂ (Xu et al., 2009). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados demuestran una inducción de p-65 (NF- κ B) y sobre-expresión de la proteína TFAM (Chimienti et al., 2018) y PGC-1 después de añadir el péptido A β ₁₋₄₂ a los astrocitos en cultivo primario. Además, nuestros resultados indican que la biogénesis mitocondrial puede estar involucrada en la protección neuronal frente al daño ocasionado por el péptido tóxico A β ₁₋₄₂. Estos efectos podrían ser debidos a la proteína

TFAM ya que la sobre-expresión de TFAM en astrocitos probablemente produce protección del ADN mitocondrial frente al péptido A β ₁₋₄₂. TFAM podría proteger al ADN mitocondrial del estrés oxidativo y de la inflamación cubriendo regiones de ese ADN mitocondrial (Kang et al., 2007; Hayashi et al., 2008), así como manteniendo el número de copias de ADN mitocondrial (Jeng et al., 2008). Por otra parte, TFAM podría aumentar la biogénesis mitocondrial controlando la disfunción mitocondrial mediante el inicio de la transcripción del ADN mitocondrial (Lin and Beal, 2006; Lee et al., 2005).

La proteína SIRT-1 juega un papel importante en las reacciones de de-acetilación de diferentes proteínas, tales como factores de transcripción involucrados en regulación metabólica, modulación del estrés, supervivencia celular, envejecimiento y procesos inmunes o inflamatorios (Chung et al., 2010; Ransohoff and Engelhardt, 2012). La expresión de sirtuínas se incrementa en la restricción calórica ocurrida en el tejido cerebral (Nisoli et al., 2005) y un dato importante es que se ha detectado disminución significativa de esta proteína en los pacientes con enfermedad de Alzheimer (Kumar et al., 2013). La proteína SIRT-1 modula la expresión de la transcripción de la proteína PGC-1 y la actividad del factor de transcripción NF- κ B en tejido cardíaco de rata (Jian et al., 2011). Por otra parte, la sobre-expresión o la disminución de la

expresión de la proteína PGC-1 determina la biogénesis mitocondrial a través de la proteína TFAM (Kang and Li, 2012). En nuestros resultados, el péptido tóxico A β ₁₋₄₂ disminuye la expresión proteica de SIRT-1 en cultivos primarios de astrocitos, produciendo un aumento de la expresión de la proteína PGC-1 y de TFAM ocasionando un aumento de la biogénesis mitocondrial. Por otra parte, el péptido tóxico A β ₁₋₄₂ disminuye la expresión del factor de transcripción PPAR- γ conduciendo a un aumento de la expresión de la proteína NF- κ B (Ye, 2008). Este factor de transcripción facilita la fosforilación de la proteína PGC-1 provocando un aumento de la proteína TFAM que conduciría finalmente a un incremento de la biogénesis mitocondrial (Fig. 83).

La proteína p38 (una MAPk dependiente de mitógenos) y por ende su forma fosforilada, están involucradas en la comunicación intercelular. Su expresión y salida al exterior, provoca la entrada al interior celular de las citoquinas pro-inflamatorias. Estas desarrollarán una serie de procesos como la producción de más citoquinas pro-inflamatorias y por lo tanto el aumento de la inflamación y el daño celular, según el momento celular y su edad (Cuenda and Rousseau, 2007). En los resultados de esta tesis p-p38 presenta un aumento significativo en las células expuestas al péptido tóxico en comparación con las células control, indicando que este

aumento podría estar relacionado con los cambios detectados en las proteínas pro-inflamatorias analizadas.

Respecto a la proteína p53 también llamada el "guardián del genoma", codifica un factor de transcripción nuclear de 43.7 KDa. Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. El gen p53 es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular (Jazvinščak et al., 2018). Un p53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferaran dando por resultado cáncer. Los datos sobre p53 que aparecen en esta tesis indican que el péptido tóxico aumenta significativamente la expresión proteica de esta proteína, apoyando la hipótesis de que en el caso de la enfermedad de Alzheimer, existe un aumento de la apoptosis, y cambios en la proliferación celular y por lo tanto de la reparación de las células dañadas.

En general, nuestros resultados indican que la exposición al péptido A β ₁₋₄₂ induce biogénesis mitocondrial en cultivo primario de astrocitos que podría favorecer el efecto protector de estas células sobre las neuronas. Si el péptido tóxico se encuentra en grandes cantidades en el cerebro, o en las células, probablemente los astrocitos morirían ocasionando la

imposibilidad de defensa de las neuronas y la muerte neuronal en última instancia.

Los astrocitos están involucrados en la homeostasis cerebral, la función neural, el soporte metabólico a las neuronas y también en la síntesis de glutatión y de sus precursores (Barreto et al., 2011). El mecanismo exacto de cómo los astrocitos protegen a las neuronas permanece sin descubrir. Qin y col. han publicado que la biogénesis mitocondrial está alterada en los enfermos de Alzheimer (Qin et al., 2009). Ya que la presencia de los astrocitos previene de la peroxidación lipídica neuronal ocasionada por el péptido $A\beta_{1-42}$, con todos los resultados de esta tesis mencionados con anterioridad podemos realizar la hipótesis de que el aumento de la biogénesis mitocondrial en los astrocitos en cultivo primario proporciona la demanda de gran cantidad de energía necesaria para disminuir la liberación de radicales libres producidos por el péptido tóxico $A\beta_{1-42}$. De hecho, este mecanismo podría proteger a las neuronas del aumento de la peroxidación lipídica (Fig 83).

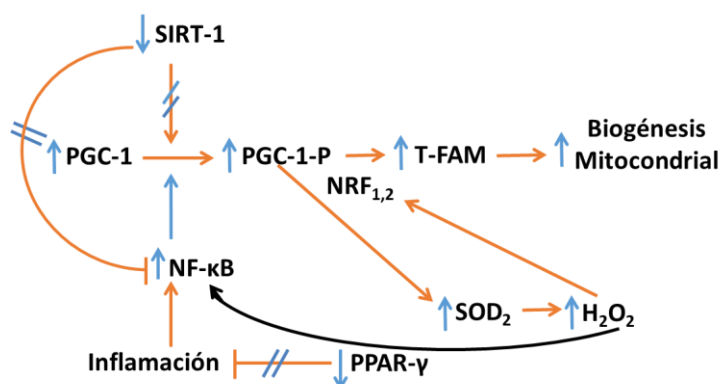


Figura 83: Señalización de astrocitos expuestos a $A\beta_{1-42}$

PGC-1 y TFAM se inducen por estrés oxidativo e inflamación. PPAR- γ disminuye cuando PGC-1 aumenta. En nuestros experimentos la proteína SIRT-1 disminuye, poniendo de manifiesto la disminución de la capacidad de los astrocitos para volver al estado de células no diferenciadas.

En conclusión, nuestros resultados indican que los astrocitos deben tener un papel clave en la protección de las neuronas frente al péptido tóxico $A\beta_{1-42}$ mediante el aumento de la viabilidad celular y la biogénesis mitocondrial, obteniendo una mejor protección frente al estrés oxidativo y quizás modulando los procesos inflamatorios. Esto podría ser una señal de complejos procesos epigenéticos en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Respecto a los hallazgos de este estudio con la sustancia Ranolazina (Rn), el fármaco redujo la liberación de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β y TNF- α , aumentó la

proteína anti-inflamatoria PPAR- γ , así como la expresión de las enzimas anti-oxidantes Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en cultivo primario de astrocitos. Además, la proteína Rn aumentó la viabilidad y proliferación de los astrocitos y disminuyó la liberación de LDH, de la actividad de la caspasa 3 y de la apoptosis producida por la vía de la activación de la proteína Smac/Diablo. Por otra parte, no se observaron efectos producidos por el fármaco Rn en neuronas en cultivo primario.

Sustancias anti-inflamatorias pueden actuar en algunas células gliales (Forshammar et al., 2013). El fármaco Rn puede cruzar la barrera hematoencefálica llegando al cerebro y alcanzar hasta un tercio de los niveles existentes en plasma (Kahlig et al., 2010). El fármaco Rn actúa como un agente anti-inflamatorio al reducir tanto la dimetilarginina asimétrica como el nivel plasmático de la proteína C-reactiva (Deshmukh et al., 2009), reduciendo significativamente el tamaño del infarto (Zacharowski et al., 2001). A concentraciones terapéuticas el fármaco Rn bloquea los canales de sodio voltaje-dependientes (VGSCs), preferentemente la corriente de sodio tardía (INAL) (Zaza et al., 2008). Los inhibidores de los canales de sodio ejercen efectos neuro-protectores en modelos experimentales de isquemia cerebral (Lei et al., 2001) y en lesión traumática cerebral (Huang et al., 2014). Además, los fármacos fenitoína y carbamazepina han sido eficaces en modelos animales de

encefalomielitis autoinmune (EAE) (Black et al., 2007). Por otra parte, la tetrodotoxina atenuó la astrogliosis inducida por un aumento de los canales de sodio voltaje-dependientes en un modelo de lesión mecánica in vitro de rata (Pappalardo et al., 2014).

La astrogliosis reactiva ocurre en respuesta al daño al SNC produciendo cambios en muchas funciones astrocíticas, incluyendo el estrés oxidativo y la inflamación, contribuyendo a las lesiones del SNC (Sofroniew and Vinters, 2010). Nuestro estudio demuestra que el fármaco Rn disminuye la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α en cultivos primarios de astrocitos. En condiciones normales, hay un equilibrio entre citoquinas pro- y anti-inflamatorias para mantener el equilibrio celular. La mayoría de las citoquinas a muy bajas concentraciones regulan las actividades celulares, incluyendo la supervivencia celular, el crecimiento, y la diferenciación (Smith et al., 2012). Los astrocitos tienen un papel preponderante en la neuro-inflamación y además, dependiendo del estímulo, la localización y el curso del daño, los astrocitos reactivos pueden ejercer efectos tanto pro- como anti-inflamatorios (Sofroniew and Vinters, 2010; Barreto et al., 2011). La astrogliosis reactiva (Block et al., 2013) también puede ser activada por varios mediadores inflamatorios como IL-1 β y TNF- α (Sofroniew and Vinters, 2010; Wyss-Coray,

2006). El proceso inflamatorio prolongado o incontrolado presenta resultados perjudiciales, exacerbando el dolor neural por sobreexpresión de factores pro-inflamatorios que intensifican la inflamación a través de un ciclo de retroalimentación positiva y además, induciendo la producción de más citoquinas o especies de reactivas de oxígeno (ROS), entre otros efectos nocivos (Sofroniew and Vinters, 2010; Smith et al., 2012; Rossi and Volterra, 2009; Fuller et al., 2010; Whitney et al., 2009). Las citoquinas pro-inflamatorias pueden aumentar la excitabilidad neuronal por liberación astrocítica de glutamato por un mecanismo Ca^{2+} dependiente, resultando en daño excitotóxico a las neuronas, y también induciendo apoptosis en neuronas y células gliales (Choi et al., 2014). En este sentido, $\text{TNF-}\alpha$ puede directamente provocar apoptosis a través del receptor TNF-R1 mientras que la apoptosis producida por la citoquina IL-1 depende de otros mediadores como $\text{IFN-}\gamma$ o $\text{TNF-}\alpha$. Además, las citoquinas pro-inflamatorias pueden también provocar un aumento de factores neurotóxicos como ROS y óxido nítrico (NO) (Smith et al., 2012). Concentraciones elevadas de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$, han sido encontradas en sangre, CSF y otros tejidos en enfermedades de Alzheimer y Parkinson, en esclerosis lateral amiotrófica y en hemorragia subaracnoidea severa, evidenciando la participación de la inflamación en la patogénesis y en los resultados conseguidos

en estas enfermedades (Smith et al., 2012; Fuller et al., 2010; Kooijman et al., 2014). TNF- α puede también inducir la expresión de otras citoquinas, como IL-1, y ambas tienen la capacidad de inducir IL-6, un marcador de respuesta inflamatoria sistémica (Clark et al., 2010). Respecto a los canales de sodio, el bloqueo de los canales de sodio atenúa la liberación de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α de la microglía estimulada (Black and Waxman, 2013; Black et al., 2009). Además, el bloqueo de los canales de sodio con fentoína reduce la secreción de IL-1 y TNF- α estimulada por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) sin afectar a los niveles anti-inflamatorios de la citoquina IL-10, resultados obtenidos dentro de un estudio realizado en un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune (EAE), disminuyendo la severidad de la enfermedad (Black et al., 2009). En nuestro estudio el fármaco Rn disminuyó la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en todos los rangos de concentración de Rn estudiados y fue probado dentro del rango de concentraciones con efectos terapéuticos (Ning et al., 2011).

Los resultados también demuestran por primera vez un aumento de la expresión de PPAR- γ en cultivos primarios de astrocitos tratados con Rn. PPAR- γ es un factor de transcripción activado por ligando que afecta a la expresión o actividad de varios genes, incluyendo aquellos involucrados en

la regulación de la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de la obtención de energía y la inflamación (Chen et al., 2012; Heneka et al., 2007). Todas las evidencias encontradas en los resultados apoyan la hipótesis de que el PPAR- γ actúa como un factor anti-inflamatorio celular (Heneka et al., 2007; Ferguson et al., 2014). En enfermedades neurodegenerativas como en el accidente cerebrovascular o ictus, en el Alzheimer (Chen et al., 2012; Vallés et al., 2010; Wang et al., 2010) y en la enfermedad de Parkinson (Chen et al., 2012), se ha demostrado que los agonistas de la proteína PPAR- γ actúan como agentes neuroprotectores (Chen et al., 2012). Además, Hu y colaboradores, en un estudio con un modelo experimental de músculo esquelético de ratón, encontraron que PPAR- γ mejora el almacenamiento de energía celular y aumenta la señalización de la insulina, con efectos beneficiosos en la salud metabólica y la reparación tisular (Hu et al., 2012). Por otra parte, la inflamación contribuye al daño cerebral secundario y algunos estudios han demostrado que la proteína anti-inflamatoria PPAR- γ reduce la inflamación tras producirse un ataque fulminante isquémico y hemorrágico (Aronowski and Hall, 2005; Luo et al., 2006; Sundararajan et al., 2005). Además, la activación de la proteína PPAR- γ suprime NF- κ B (Genolet et al., 2004; Wan et al., 2008), que controla la expresión de varios genes involucrados en respuestas inflamatorias (Ghosh et al., 2002).

Datos recientes sugieren que la ruta inhibitoria de NF- κ B puede estimular a los neutróficos con fenotipo N2 y producir efectos neuroprotectores (Cuartero et al., 2013). La proteína PPAR- γ también participa en la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2, el cual está asociado con acciones anti-inflamatorias y de reparación tisular (Bouhlef et al., 2007). En el campo del cáncer, los agonistas de la proteína PPAR- γ poseen efectos antitumorales en combinación con fármacos quimioterápicos (Wallace et al., 2000b) o con otras terapias diana y deben representar una estrategia prometedora y futura en el tratamiento de las malignidades (Hatton and Yee, 2008; Belfiore et al., 2009). Se conoce desde 1999 que además de sus efectos anti-inflamatorios PPAR- γ puede incrementar la expresión de la proteína Cu/Zn-SOD (Yoo et al., 1999). Estos datos coinciden con nuestros resultados, donde la proteína Rn aumenta significativamente la expresión de PPAR- γ y de Cu/Zn-SOD. Zhao y sus colaboradores, en un modelo knock-out de ratón neuroespecífico para PPAR- γ , demostró que la deficiencia en la expresión de PPAR- γ neuronal conducía a un aumento en el daño cerebral en respuesta a la isquemia y al daño oxidativo (Zacharowski et al., 2001). Además, los agonistas de PPAR- γ se ha demostrado que pueden ser útiles para la eliminación del estrés oxidativo inducido por daño isquémico y cerebral (Zacharowski et al., 2001; Zhao et al., 2009). Moléculas antioxidantes, tales como Cu/Zn-SOD y Mn-

SOD, poseen lugares de unión en la región promotora para el factor de transcripción PPAR- γ y la expresión proteica de estas proteínas está directamente regulada por PPAR- γ (Chan, 2001; Inoue et al., 2001). El fármaco Rn aumenta la oxidación de la glucosa que a su vez disminuye la oxidación de los ácidos grasos, mejorando el consumo de oxígeno y reduciendo la producción de lactato y de esta manera atenúa el daño isquémico mitocondrial (McCormack et al., 1996; Gadicherla et al., 2012). Estos cambios se producen en diferentes condiciones y trastornos neurodegenerativos, incluyendo la isquemia (Ding et al., 2007).

En astrocitos y microglía, ROS y las especies reactivas de nitrógeno se ocasionan en las enfermedades neurodegenerativas (Liberatore et al., 1999; Knott et al., 2000). El principal mecanismo de defensa antioxidante que subyace a estas condiciones patofisiológicas engloba la activación de enzimas antioxidantes, tales como la proteína superóxido dismutasa (SOD). SOD regula la concentración de radicales superóxidos por catalización del cambio de superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fridovich et al., 1995). Podría ser posible que el fármaco Rn jugara un papel importante en este mecanismo ya que se ha publicado que disminuye la liberación de H_2O_2 e induce hipoxia mediante INAL (Song and Belardinelli 2009; Ma et al., 2014).

Los resultados presentados en esta tesis sobre el ensayo de exclusión de azul de tripán indican que ocurre un aumento de la proliferación después de la adición del fármaco Rn, de una manera dependiente de la concentración. Los mecanismos que subyacen a la proliferación y a la supervivencia de los astrocitos pueden incluir las vías de señalización de las MAPK, las moléculas reguladoras del ciclo celular y microRNAs, actuando independientemente o juntos para regular la astrogénesis (Chi et al., 2016). Además, factores como el factor neurotrófico ciliar (CNTF) están implicados en la neurogénesis ocurrida en ratones adultos (Yang et al., 2008b). Los astrocitos producen CNTF y expresan CNTF receptor α por lo que este factor podría estar involucrado en la astrogénesis. Queda por determinar si la proteína Rn aumenta la proliferación astrocitica al aumentar CNTF.

Nuestros datos con el ensayo MTT indican que el fármaco Rn incrementó significativamente la viabilidad astrocitaria comparado con las células control, sin producir efectos en los cultivos de neuronas. El ensayo de MTT se usa en muchos laboratorios de investigación como método para determinar la viabilidad celular y por su facilidad de uso y reproductibilidad. Este método de ensayo de la viabilidad celular y de la citotoxicidad se usa en células que son expuestas a distintas

sustancias tóxicas o sustancias que favorecen la viabilidad (Rönicke et al., 2008; Xing et al., 2014).

En los experimentos realizados en esta tesis, el fármaco Rn disminuyó un 15% (10^{-6} M) y un 20% (10^{-5} M) la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) desde los astrocitos control, sugiriendo una disminución en la muerte celular por necrosis (Zhang et al., 2014; Gu et al., 2016). Además, la proteína Rn protegió a los astrocitos de los efectos dañinos del péptido tóxico $A\beta_{1-42}$. Este péptido ocasionó un aumento significativo del 75% en la liberación de LDH. Cuando se incubó con el fármaco Rn se produjo una disminución significativa de los niveles de LDH de un 60%, indicando que existe un efecto de este fármaco contra el péptido tóxico $A\beta_{1-42}$. Los efectos beneficiosos de la proteína Rn en el sistema nervioso central necesitan ser estudiados en más profundidad ya que los efectos del fármaco Rn en la viabilidad celular son probablemente dependientes del tipo celular. En nuestros experimentos, las células reaccionan de forma diferente cuando son expuestas a Rn, estimulando la viabilidad celular en los astrocitos sin producirse ningún efecto en las neuronas. Por otro lado, el fármaco Rn disminuye la actividad de la Caspasa 3 un 25% (Rn 10^{-6} M) y un 40% (Rn 10^{-5} M), sugiriendo que la proteína Rn inhibe la apoptosis en los astrocitos en cultivo primario. Además, el péptido $A\beta_{1-42}$ aumentó la actividad

de la Caspasa 3 (105%) que fue revertido por la proteína Rn en un 85%, mostrando que esta proteína previene a la célula de la apoptosis inducida por A β ₁₋₄₂.

La activación secuencial de las caspasas juega un papel principal en la apoptosis celular. La Caspasa 3 tiene efectos críticos y múltiples que conducen a la apoptosis, especialmente bajo inductores específicos de muerte celular (Porter and Jänicke, 1999). El proceso de apoptosis se asocia con la liberación de las proteínas Citocromo-c y Smac/Diablo (Liu et al., 1996; Du et al., 2000) desde la mitocondria al citosol en respuesta a fármacos citotóxicos o al daño al ADN. En este sentido, el fármaco Rn disminuye la liberación de Citocromo c en corazón aislado de conejillos de indias (Aldakkak et al., 2011).

La proteína Smac/Diablo produce apoptosis neutralizando a uno o más miembros de las proteínas de la familia IAP (proteínas inhibitorias de la apoptosis) (Colin et al., 2016). Nuestros resultados demuestran una disminución de la expresión de la proteína Smac/Diablo después de la adición del fármaco Rn en astrocitos en cultivo primario comparado con células control. Además, es posible que la disminución en la

muerte celular que encontramos con la proteína Rn pueda estar asociada con la inactivación de la vía apoptótica mitocondrial.

Estos resultados demuestran por primera vez que el fármaco Rn induce un aumento en la viabilidad y proliferación de los astrocitos, disminuyendo la muerte celular mediante la reducción de la liberación de LDH y de la apoptosis gracias a la reducción de la expresión de la proteína Smac/Diablo, Citocromo c y de la actividad de la Caspasa-3. Además, la proteína Rn produce disminución de mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF- α , aumenta los anti-inflamatorios como la proteína PPAR- γ , e incrementa la expresión de las proteínas anti-oxidantes Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en los astrocitos en cultivo primario (Fig. 84). Sin embargo, en neuronas en cultivo primario ninguno de estos efectos fue detectado bajo nuestras condiciones de experimentación. Futuros estudios serán necesarios para comprender el papel del fármaco Rn como un agente neuro-protector frente a diferentes desórdenes neurodegenerativos, como las enfermedades neurodegenerativas, vasculares, inflamatorias o traumáticas.

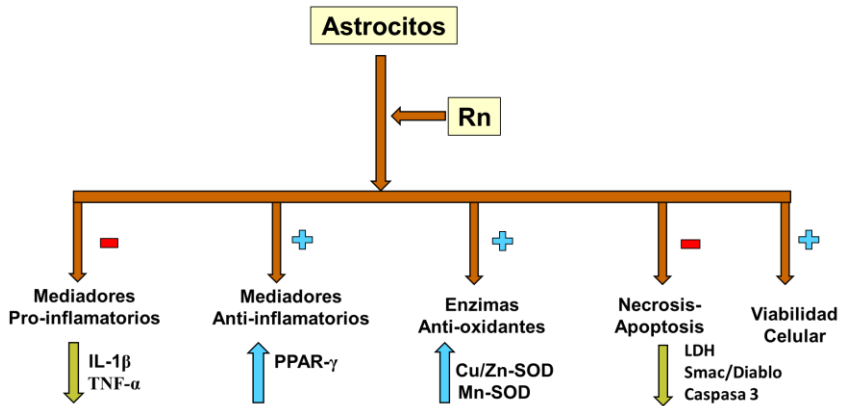


Figura 84: Efectos de Rn en astrocitos en cultivo primario

La ranolazina aumenta la viabilidad celular, la respuesta anti-inflamatoria y las proteínas anti-oxidantes. Por otra parte, la proteína Rn disminuye los mediadores pro-inflamatorios, la necrosis y apoptosis.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El péptido tóxico ($A\beta_{1-42}$) disminuye la viabilidad celular y aumenta la apoptosis y la peroxidación lipídica (MDA) en neuronas en cultivo primario, pero no produce cambios ni en astrocitos ni en neuronas en cultivo mixto (neuronas-astrocitos). Estos resultados indican un papel protector de los astrocitos sobre las neuronas frente a la toxicidad del péptido tóxico $A\beta_{1-42}$.
2. En astrocitos en cultivo primario se produce un aumento de la biogénesis mitocondrial y de la expresión de la proteína Mn-SOD en presencia del péptido tóxico. Ambos mecanismos podrían contribuir a la disminución del estrés oxidativo produciendo mayor protección neuronal.
3. El aumento de la expresión de la proteína p-65 (NF- κ B) que observamos en astrocitos podría no ser indicativo de muerte neuronal sino un mecanismo protector a través de un aumento en la fosforilación de PGC-1 conduciendo al incremento de los niveles de TFAM y por ende a la biogénesis mitocondrial.
4. El péptido tóxico $A\beta_{1-42}$ disminuye la expresión proteica de SIRT-1 en cultivos primarios de astrocitos, produciendo un aumento de la expresión de PGC-1 y TFAM que resulta en

un incremento de la biogénesis mitocondrial. Además, disminuye la expresión de PPAR- γ conduciendo a un aumento de la expresión de NF- κ B que a su vez induciría los cambios indicados en el punto 3.

5. El fármaco Rn induce un aumento en la viabilidad y proliferación de los astrocitos, disminuyendo la muerte celular mediante la reducción de la liberación de LDH y de la apoptosis gracias a la reducción de la expresión de la proteína Smac/Diablo, Citocromo c y de la actividad de la Caspasa 3 en astrocitos en cultivo primario. No así en neuronas en cultivo primario tras la adición de la Rn.
6. El fármaco Rn produce disminución de mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF- α , aumenta los anti-inflamatorios como la proteína PPAR- γ , e incrementa la expresión de las proteínas anti-oxidantes Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en los astrocitos en cultivo primario sin encontrarse ningún cambio en lo que respecta a las neuronas en cultivo primario.

En conclusión, nuestros resultados indican que los astrocitos deben tener un papel clave en la protección de las neuronas frente al péptido tóxico A β ₁₋₄₂ mediante el aumento de la viabilidad celular y la biogénesis mitocondrial, obteniendo una mejor protección frente al

estrés oxidativo y quizás modulando los procesos inflamatorios. Además, el fármaco Rn tiene un efecto protector frente al péptido tóxico en astrocitos y no en neuronas en cultivo primario, por lo que la protección producida por la Rn en la neurodegeneración estaría realizada a través de los astrocitos protegiendo en última instancia a las neuronas.

8.BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53. Review.
- Abeti R, Duchon MR. (2012). Activation of PARP by Oxidative Stress Induced by β -Amyloid: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 37(11), 2589-2596.
- Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 2001 Dec 3;20(23):6627-36.
- Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2010;16(25):2766-78. Review.
- Aguirre-Rueda D, Guerra-Ojeda S, Aldasoro M, Iradi A, Obrador E, Ortega A, Mauricio MD, Vila JM, Valles SL. Astrocytes protect neurons from A β 1-42 peptide-induced neurotoxicity increasing TFAM and PGC-1 and decreasing PPAR- γ and SIRT-1. *Int J Med Sci.* 2015b Jan 1;12(1):48-56. doi: 10.7150/ijms.10035.
- Aguirre-Rueda D, Guerra-Ojeda S, Aldasoro M, Iradi A, Obrador E, Mauricio MD, Vila JM, Marchio P, Valles SL. WIN 55,212-2, agonist of cannabinoid receptors, prevents amyloid β 1-42 effects on astrocytes in primary culture. *PLoS One.* 2015a Apr 13;10(4):e0122843. doi: 10.1371/journal.pone.0122843.
- Agulhon C, Petravic J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiocco TA, McCarthy KD. What is the role

- of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. 2008 Sep 25;59(6):932-46. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.004. Review.
- Ahmed M, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, Elliott JI, Van Nostrand WE, Smith SO. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 May;17(5):561-7. doi: 10.1038/nsmb.1799.
 - Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):38105-8. Epub 2003 Jul 30. Review.
 - Aldakkak M, Camara AK, Heisner JS, Yang M, Stowe DF. Ranolazine reduces Ca²⁺ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res*. 2011 Oct;64(4):381-92. doi: 10.1016/j.phrs.2011.06.018.
 - Aldasoro M, Guerra-Ojeda S, Aguirre-Rueda D, Mauricio MD, Vila JM, Marchio P, Iradi A, Aldasoro C, Jorda A, Obrador E, Valles SL. Effects of Ranolazine on Astrocytes and Neurons in Primary Culture. *PLoS One*. 2016 Mar 7;11(3):e0150619. doi: 10.1371/journal.pone.0150619.
 - Allan LM, Rowan EN, Firbank MJ, Thomas AJ, Parry SW, Polvikoski TM, O'Brien JT, Kalaria RN. Long term incidence of dementia, predictors of mortality and pathological diagnosis in older stroke survivors. *Brain*. 2011 Dec;134(Pt 12):3716-27. doi: 10.1093/brain/awr273.
 - Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Oct;2(10):734-44. Review.
 - Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003 Oct 29;358(1438):1669-77. Review.

- Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res.* 2003 Nov 1;74(3):342-52. Review.
- Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology.* 1999 Dec 10;53(9):1992-7.
- Angosto D, López-Castejón G, López-Muñoz A, Sepulcre MP, Arizcun M, Meseguer J, Mulero V. Evolution of inflammasome functions in vertebrates: Inflammasome and caspase-1 trigger fish macrophage cell death but are dispensable for the processing of IL-1 β . *Innate Immun.* 2012 Dec;18(6):815-24. doi: 10.1177/1753425912441956.
- Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):50-7. Review.
- Armstrong RA. What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathol.* 2013;51(3):169-88. Review.
- Arnold M, Slezak A, El-Koussy M, Lüdi R, Findling O, Mono ML, Heldner MR, Fischer U, Mordasini P, Schroth G, Mattle HP, Gralla J, Jung S. Occlusion Location of Middle Cerebral Artery Stroke and Outcome after Endovascular Treatment. *Eur Neurol.* 2015;74(5-6):315-21. doi: 10.1159/000441445.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex

- of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*. 1991 Jan-Feb;1(1):103-16.
- Aronowski J, Hall CE. New horizons for primary intracerebral hemorrhage treatment: experience from preclinical studies. *Neurol Res*. 2005 Apr;27(3):268-79. Review.
 - Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 31;301(1):231-5.
 - Aschner M, Kimelberg HK. The use of astrocytes in culture as model systems for evaluating neurotoxic-induced-injury. *Neurotoxicology*. 1991 Fall;12(3):505-17. Review.
 - Auld DS, Robitaille R. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron*. 2003 Oct 9;40(2):389-400. Review.
 - Azizi SA, Krynska B. Derivation of neuronal cells from fetal normal human astrocytes (NHA). *Methods Mol Biol*. 2013;1078:89-96. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_8.
 - Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β -peptide interacting domain (A β ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene*. 2011 Nov 15;488(1-2):13-22. doi: 10.1016/j.gene.2011.06.017.
 - Balcz B, Kirchner L, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Increased brain protein levels of carbonyl reductase and alcohol dehydrogenase in Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2001;(61):193-201.

- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004 Jun;16(1):1-13. Review.
- Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 1999 Aug;31(4):347-66. Review.
- Barnum SR. Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res.* 2002;26(1-3):7-13. Review.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol.* 1992 Nov;23(9):1221-30. Review.
- Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y, Morales L. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res.* 2011 Oct;71(2):107-13. doi: 10.1016/j.neures.2011.06.004.
- Bartolo A, Daumüller M, Della Sala S, Goldenberg G. Relationship between Object-Related Gestures and the Fractionated Object Knowledge System. *Behavioural Neurology.* 2007;18(3):143-147. doi:10.1155/2007/241670.
- Baruch-Suchodolsky R, Fischer B. Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry.* 2009 May 26;48(20):4354-70. doi: 10.1021/bi802361k.
- Becerra A, Warke RV, Martin K, Xhaja K, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. *J Med Virol.* 2009 Aug;81(8):1403-11.

- Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H. Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart*. 2006 Jul;92 Suppl 4:iv6-iv14.
- Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. PPAR- γ Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Research*. 2009;2009:830501. doi:10.1155/2009/830501.
- Bernabeu-Zornoza A, Coronel R, Lachgar M, Palmer C, Liste I. Effects of Amyloid- β Peptide on the Biology of Human Neural Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2018;1779:381-398. doi: 10.1007/978-1-4939-7816-8_23.
- Black JA, Liu S, Carrithers M, Carrithers LM, Waxman SG. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis after withdrawal of phenytoin and carbamazepine. *Ann Neurol*. 2007 Jul;62(1):21-33.
- Black JA, Liu S, Waxman SG. Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*. 2009 Aug 1;57(10):1072-81. doi: 10.1002/glia.20830.
- Black JA, Waxman SG. Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2013 Oct 16;80(2):280-91. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.012. Review.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul 29;368(9533):387-403. Review.
- Block L, Jörneberg P, Björklund U, Westerlund A, Biber B, Hansson E. Ultralow concentrations of bupivacaine exert anti-inflammatory effects on inflammation-reactive astrocytes. *The European Journal of Neuroscience*. 2013;38(11):3669-3678. doi:10.1111/ejn.12364.

- Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Kettermann AJ, Barr RK. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 11;1697(1-2):89-101. Review.
- Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007 Aug;6(2):137-43.
- Boutajangout A, Wisniewski T. Tau-based therapeutic approaches for Alzheimer's disease - a mini-review. *Gerontology*. 2014;60(5):381-5. doi: 10.1159/000358875. Epub 2014 Apr 8. Review.
- Bozner P, Grishko V, LeDoux SP, Wilson GL, Chyan YC, Pappolla MA. The amyloid beta protein induces oxidative damage of mitochondrial DNA. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997 Dec;56(12):1356-62.
- Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem*. 2002 Apr;269(8):1996-2002. Review.
- Cacabelos R, Takeda M, Winblad B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1999 Jan;14(1):3-47. Review.
- Camins A, Pallas M, Silvestre JS. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic

- approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2008 Jan-Feb;30(1):43-65. doi: 10.1358/mf.2008.30.1.1090962. Review.
- Capucci A, Cipolletta L, Guerra F, Giannini I. Emerging pharmacotherapies for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2018 Mar;23(1):25-36. doi: 10.1080/14728214.2018.1446941.
 - Carney JM, Smith CD, Carney AM, Butterfield DA. Aging- and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Nov 17;738:44-53.
 - Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arévalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A. Oligomers of β -amyloid protein ($A\beta$ 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin- 1β , tumour necrosis factor- α , and a nuclear factor κ -B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol*. 2012 Aug;236(2):215-27. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.05.004.
 - Casanova I, Bosch R, Lasa A, Parreño M, Céspedes MV, Brunet S, Nomdedéu JF, Mangués MA, Sierra J, Mangués R. A celecoxib derivative inhibits focal adhesion signaling and induces caspase-8-dependent apoptosis in human acute myeloid leukemia cells. *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):217-26. doi: 10.1002/ijc.23516.
 - Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002 May;132(1):1-15. Review.
 - Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, Skopal J, Chumakova G, Kuch J, Wang W, Skettino SL, Wolff AA; Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina (CARISA) Investigators. Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise

- tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004a Jan 21;291(3):309-16.
- Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, Pepine CJ, Wang W, Nelson JJ, Hebert DA, Wolff AA; MARISA Investigators. Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol*. 2004b Apr 21;43(8):1375-82.
 - Chaitman BR. Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation*. 2006 May 23;113(20):2462-72. Review.
 - Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001 Jan;21(1):2-14. Review.
 - Chen BS, Lo YC, Peng H, Hsu TI, Wu SN. Effects of ranolazine, a novel anti-anginal drug, on ion currents and membrane potential in pituitary tumor GH(3) cells and NG108-15 neuronal cells. *J Pharmacol Sci*. 2009 Jul;110(3):295-305.
 - Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*. 2003b Sep 19;278(38):36027-31.
 - Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003a Feb;23(2):137-49. Review.
 - Chen YC, Wu JS, Tsai HD, Huang CY, Chen JJ, Sun GY, Lin TN. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 2012 Aug;46(1):114-24. doi: 10.1007/s12035-012-8259-8.

- Chi C, Ronai D, Than MT, Walker CJ, Sewell AK, Han M. Nucleotide levels regulate germline proliferation through modulating GLP-1/Notch signaling in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2016 Feb 1;30(3):307-20. doi: 10.1101/gad.275107.115.
- Chimienti G, Picca A, Sirago G, Fracasso F, Calvani R, Bernabei R, Russo F, Carter CS, Leeuwenburgh C, Pesce V, Marzetti E, Lezza AMS. Increased TFAM binding to mtDNA damage hot spots is associated with mtDNA loss in aged rat heart. *Free Radic Biol Med*. 2018 Jun 30;124:447-453.
- Chitnis T, Weiner HL. CNS inflammation and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2017 Oct 2;127(10):3577-3587. doi: 10.1172/JCI90609.
- Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS One*. 2014 Apr 1;9(4):e92325. doi: 10.1371/journal.pone.0092325.
- Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Sep 1;501(1):79-90. doi: 10.1016/j.abb.2010.05.003.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 1992 Dec 17;360(6405):672-4.
- Clark IA, Alleva LM, Vissel B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther*. 2010 Dec;128(3):519-48. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.007.
- Cole GM, Morihara T, Lim GP, Yang F, Begum A, Frautschy SA. NSAID and antioxidant prevention of Alzheimer's disease: lessons

- from in vitro and animal models. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1035:68-84. Review.
- Colin J, Allouche A, Chauveau F, Corbier C, Pauron-Gregory L, Lanhers MC, Claudepierre T, Yen FT, Oster T, Malaplate-Armand C. Improved Neuroprotection Provided by Drug Combination in Neurons Exposed to Cell-Derived Soluble Amyloid- β Peptide. *J Alzheimers Dis.* 2016 May 7;52(3):975-87.
 - Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2001 Feb 15;21(4):1179-88.
 - Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008 Oct 25;372(9648):1502-17. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
 - Costacou T, Evans RW, Schafer GL, Orchard TJ. Oxidative Stress and Response in Relation to Coronary Artery Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(11):3503-3509. doi:10.2337/dc12-2378.
 - Cribbs DH, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M. Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2004 Aug;165(2):353-5. Review.
 - Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, Corbí ÁL, Lizasoain I, Moro MA. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone. *Stroke.* 2013 Dec;44(12):3498-508. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002470.
 - Cuenca-López MD, Brea D, Segura T, Galindo MF, Antón-Martínez D, Agulla J, Castillo J, Jordán J. [Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: cellular inflammatory

- response and inflammatory mediators]. *Rev Neurol*. 2010 Mar 16;50(6):349-59. Review. Spanish.
- Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1358-75.
 - Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain*. 2007 Oct;131(3):243-57.
 - Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19. Review.
 - Das GD, Altman J. Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. *Brain Res*. 1970 Jun 30;21(1):122-7.
 - Davoust N, Vauillat C, Androdias G, Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol*. 2008 May;29(5):227-34. doi: 10.1016/j.it.2008.01.010.
 - De Jong GI, De Vos RA, Steur EN, Luiten PG. Cerebrovascular hypoperfusion: a risk factor for Alzheimer's disease? Animal model and postmortem human studies. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Sep 26;826:56-74. Review.
 - de Oliveira FF, Pereira FV, Pivi GAK, Smith MC, Bertolucci PHF. Effects of APOE haplotypes and measures of cardiovascular risk over gender-dependent cognitive and functional changes in one year in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*. 2018 May;128(5):472-476.
 - De Sant'Anna M, Morat B. [Non-drug-based management of Alzheimer's disease]. *Soins Gerontol*. 2013 Jul-Aug;(102):15-8.

- Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):378-90. doi: 10.1038/nrm2393. Review.
- Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Washimi Y, Yasuda Y, Horie K, Miyata T, Sobue G. Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2002 Aug;104(2):113-22.
- Del Moral A, Arnaudus JI, Gehring PM, Salamon MB, Ritter C, Joven E, Cullen J. Magnetic first-order phase transition and crossover associated with random anisotropy in crystalline DyxY1-xAl2. *Phys Rev B Condens Matter.* 1993 Apr 1;47(13):7892-7896.
- Del Rio-Hortega P. [Are the glia having small radiations oligodendroglia) possibly homologous to Schwann cells]. *Arch Histol Norm Patol.* 1957;7(1):1-4. Spanish.
- Del Rio-Hortega P. Are the glia with very few processes homologous with Schwann cells? by Pío del Río-Hortega. 1922. *Clin Neuropathol.* 2012 Nov-Dec;31(6):460-2.
- Deshmukh SH, Patel SR, Pinassi E, Mindrescu C, Hermance EV, Infantino MN, Coppola JT, Staniloae CS. Ranolazine improves endothelial function in patients with stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2009 Aug;20(5):343-7. doi: 10.1097/MCA.0b013e32832a198b.
- Di Carlo A, Baldereschi M, Amaducci L, Lepore V, Bracco L, Maggi S, Bonaiuto S, Perissinotto E, Scarlato G, Farchi G, Inzitari D; ILSA Working Group. Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study. *J Am Geriatr Soc.* 2002 Jan;50(1):41-8.

- Ding G, Fu M, Qin Q, Lewis W, Kim HW, Fukai T, Bacanamwo M, Chen YE, Schneider MD, Mangelsdorf DJ, Evans RM, Yang Q. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc Res.* 2007 Nov 1;76(2):269-79.
- Dodla MC, Mumaw J, Stice SL. Role of astrocytes, soluble factors, cells adhesion molecules and neurotrophins in functional synapse formation: implications for human embryonic stem cell derived neurons. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010 Sep;5(3):251-60. Review.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000; 86: 147–157.
- Dzenko KA, Weltzien RB, Pachter JS. Suppression of A beta-induced monocyte neurotoxicity by antiinflammatory compounds. *J Neuroimmunol.* 1997 Dec;80(1-2):6-12.
- Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993 May;54(1):15-36. Review.
- Eikelenboom P, van Gool WA. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2004 Mar;111(3):281-94.
- Ertekin-Taner N, Allen M, Fadale D, Scanlin L, Younkin L, Petersen RC, Graff-Radford N, Younkin SG. Genetic variants in a haplotype block spanning IDE are significantly associated with plasma Abeta42 levels and risk for Alzheimer disease. *Hum Mutat.* 2004 Apr;23(4):334-42.
- Fanaroff AC, James SK, Weisz G, Prather K, Anstrom KJ, Mark DB, Ben-Yehuda O, Alexander KP, Stone GW, Ohman EM.

- Ranolazine After Incomplete Percutaneous Coronary Revascularization in Patients With Versus Without Diabetes Mellitus: RIVER-PCI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2017 May 9;69(18):2304-2313.
- Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H. BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9712-7.
 - Ferguson LB, Most D, Blednov YA, Harris RA. PPAR agonists regulate brain gene expression: relationship to their effects on ethanol consumption. *Neuropharmacology.* 2014 Nov;86:397-407.
 - Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.* 2000 Jan;23(1):14-20. Review.
 - Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M; Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 2005 Dec 17;366(9503):2112-7.
 - Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593):556-62. Review.
 - Forshammar J, Jörneberg P, Björklund U, Westerlund A, Lundborg C, Biber B, Hansson E. Anti-inflammatory substances can influence some glial cell types but not others. *Brain Res.* 2013 Nov 20;1539:34-40. doi: 10.1016/j.brainres.2013.09.052.
 - Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA. Astrocytic GABA receptors. *Glia.* 1994 Jun;11(2):83-93. Review.

- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112. Review.
- Fu Y, Pan S, Liu Q, Gong S. [Cryopreservation and resuscitation of neural stem cells from fetal rat]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2010 Apr;24(7):311-4.
- Fuller S, Steele M, Münch G. Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat Res.* 2010 Aug 7;690(1-2):40-9. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.08.016.
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD, Van Eldik LJ, Norris CM. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2012 Nov 14;32(46):16129-40.
- Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1998 Nov;71(5):2034-40.
- Gadicherla AK, Stowe DF, Antholine WE, Yang M, Camara AK. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1817(3):419-29. doi: 10.1016/j.bbabbio.2011.11.021.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000 Feb 25;287(5457):1433-8. Review.
- Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1121-9. Review.
- Gard AL, Burrell MR, Pfeiffer SE, Rudge JS, Williams WC 2nd. Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF

- and leukemia inhibitory factor-like protein. *Development*. 1995 Jul;121(7):2187-97.
- Gasic-Milenkovic J, Loske C, Münch G. Advanced glycation endproducts cause lipid peroxidation in the human neuronal cell line SH-SY5Y. *J Alzheimers Dis*. 2003 Feb;5(1):25-30.
 - Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*. 2000 Aug;49(1-2):171-86. Review.
 - Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 1995 Mar;20(3):269-87. Review.
 - Gengler S, Gault VA, Harriott P, Hölscher C. Impairments of hippocampal synaptic plasticity induced by aggregated beta-amyloid (25-35) are dependent on stimulation-protocol and genetic background. *Exp Brain Res*. 2007 Jun;179(4):621-30.
 - Genolet R, Wahli W, Michalik L. PPARs as drug targets to modulate inflammatory responses? *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004 Dec;3(4):361-75. Review.
 - Ghosh D, LeVault KR, Barnett AJ, Brewer GJ. A reversible early oxidized redox state that precedes macromolecular ROS damage in aging nontransgenic and 3xTg AD mouse neurons. *J Neurosci*. 2012 Apr 25;32(17):5821-32.
 - Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002 Apr;109 Suppl:S81-96. Review.
 - Giaume C, Sáez JC, Song W, Leybaert L, Naus CC. Connexins and pannexins in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2017 Sep 8. pii: S0304-3940(17)30740-1. doi: 10.1016/j.neulet.2017.09.006.

- Gilbert BW, Sherard M, Little L, Branstetter J, Meister A, Huffman J. Antihyperglycemic and Metabolic Effects of Ranolazine in Patients With Diabetes Mellitus. *Am J Cardiol.* 2018 Feb 15;121(4):509-512.
- Giulian D. Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics.* 1999;65(1):13-18.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991 Feb 21;349(6311):704-6.
- Gonzalez B, Abud EM, Abud AM, Poon WW, Gyls KH. Tau Spread, Apolipoprotein E, Inflammation, and More: Rapidly Evolving Basic Science in Alzheimer Disease. *Neurol Clin.* 2017 May;35(2):175-190. doi: 10.1016/j.ncl.2017.01.001. Review.
- Götz ME, Wacker M, Luckhaus C, Wanek P, Tatschner T, Jellinger K, Leblhuber F, Ransmayr G, Riederer P, Eder E. Unaltered brain levels of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2002 May 10;324(1):49-52.
- Gould DA, Haslanger KD, Vladeck BC. Coming of age: home care in the 1990s. *Pride Inst J Long Term Home Health Care.* 1992 Winter;11(1):19-28.
- Gould HJ 3rd, Garrett C, Donahue RR, Paul D, Diamond I, Taylor BK. Ranolazine attenuates behavioral signs of neuropathic pain. *Behav Pharmacol.* 2009 Dec;20(8):755-8. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283323c90.

- Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH; Tarenflurbil Phase 3 Study Group.. Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009 Dec 16;302(23):2557-64. doi: 10.1001/jama.2009.1866.
- Griffin WS, Mrak RE. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol*. 2002 Aug;72(2):233-8. Review.
- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol*. 1998 Jan;8(1):65-72. Review.
- Gu WW, Lu SQ, Ni Y, Liu ZH, Zhou XY, Zhu YM, Luo Y, Li X, Li LS, Sun WZ, Zhang HL, Ao GZ. 2-(3',5'-Dimethoxybenzylidene) cyclopentanone, a novel synthetic small-molecule compound, provides neuroprotective effects against ischemic stroke. *Neuroscience*. 2016 Mar 1;316:26-40. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.052.
- Gubandru M, Margina D, Tsitsimpikou C, Goutzourelas N, Tsarouhas K, Ilie M, Tsatsakis AM, Kouretas D. Alzheimer's disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers. *Food Chem Toxicol*. 2013 Nov;61:209-14. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.013.
- Guetin S, Portet F, Picot MC, Defez C, Pose C, Blayac JP, Touchon J. [Impact of music therapy on anxiety and depression for patients with Alzheimer's disease and on the burden felt by the

- main caregiver (feasibility study)]. *Encephale*. 2009 Feb;35(1):57-65.
- Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia*. 2015 Mar;30(2):119-29. doi: 10.1016/j.nrl.2012.12.007.
 - Guo W, Zhu P, Brodowsky H. The study for optimization of chromatographic condition by means of artificial neural networks. *Talanta*. 1997 Nov;44(11):1995-2001.
 - Gutteridge JM, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 19;393(4):561-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071.
 - Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med*. 1992;12(1):93-5.
 - Haass C, Baumeister R. The biological and pathological function of presenilin proteins--simple cell systems and a worm in Alzheimer's disease research. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999;249 Suppl 3:23-7. Review.
 - Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*. 1993 Feb 15;268(5):3021-4.
 - Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*. 2004 Feb 11;23(3):483-8. Epub 2004 Jan 29. Review.
 - Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*. 2004 Feb 11;23(3):483-8. Review.

- Haines JD, Fulton DL, Richard S, Almazan G. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Regulates Genes during Proliferation and Differentiation in Oligodendrocytes. PLoS One. 2015 Dec 29;10(12):e0145843. doi: 10.1371/journal.pone.0145843.
- Halaris A. Inflammation, heart disease, and depression. Curr Psychiatry Rep. 2013 Oct;15(10):400. doi: 10.1007/s11920-013-0400-5. Review.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? J Lab Clin Med. 1992a Jun;119(6):598-620. Review.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem. 1992b Nov;59(5):1609-23. Review. Erratum in: J Neurochem. 2012 Mar;120(5):850.
- Hanaki M, Murakami K, Katayama S, Akagi KI, Irie K. Mechanistic analyses of the suppression of amyloid β 42 aggregation by apomorphine. Bioorg Med Chem. 2018 May 1;26(8):1538-1546. doi: 10.1016/j.bmc.2018.01.028.
- Hangen E, De Zio D, Bordi M, Zhu C, Dessen P, Caffin F, Lachkar S, Perfettini JL, Lazar V, Benard J, Fimia GM, Piacentini M, Harper F, Pierron G, Vicencio JM, Bénit P, de Andrade A, Höglinger G, Culmsee C, Rustin P, Blomgren K, Cecconi F, Kroemer G, Modjtahedi N. A brain-specific isoform of mitochondrial apoptosis-inducing factor: AIF2. Cell Death Differ. 2010 Jul;17(7):1155-66. doi: 10.1038/cdd.2009.211.
- Harada J, Sugimoto M. Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. Brain Res. 1999 Sep 25;842(2):311-23.

- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):184-5. Review.
- Hatton JL, Yee LD. Clinical Use of PPARgamma Ligands in Cancer. *PPAR Res*. 2008;2008:159415. doi: 10.1155/2008/159415.
- Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H. Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci*. 2008 Aug 20;28(34):8624-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1957-08.2008.
- Henderson VW. Alzheimer's disease: review of hormone therapy trials and implications for treatment and prevention after menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Jul;142:99-106. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.05.010.
- Heneka MT, Landreth GE, Hüll M. Drug insight: effects mediated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in CNS disorders. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007 Sep;3(9):496-504. Review.
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem*. 1995 Nov;65(5):2146-56.
- Hermon M, Cairns N, Egly JM, Fery A, Labudova O, Lubec G. Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1998 Jul 17;251(1):45-8.

- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 2000 Mar 15;20(6):2218-28.
- Hoyos V, Del Bufalo F, Yagyu S, Ando M, Dotti G, Suzuki M, Bouchier-Hayes L, Alemany R, Brenner MK. Mesenchymal Stromal Cells for Linked Delivery of Oncolytic and Apoptotic Adenoviruses to Non-small-cell Lung Cancers. *Mol Ther.* 2015 Sep;23(9):1497-506. doi: 10.1038/mt.2015.110.
- Hu S, Yao J, Howe AA, Menke BM, Sivitz WI, Spector AA, Norris AW. Peroxisome proliferator-activated receptor γ decouples fatty acid uptake from lipid inhibition of insulin signaling in skeletal muscle. *Mol Endocrinol.* 2012 Jun;26(6):977-88. doi: 10.1210/me.2011-1253.
- Huang X, Li W, Lin Y, et al. Blockage of the Upregulation of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.3 Improves Outcomes after Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma.* 2014;31(4):346-357. doi:10.1089/neu.2013.2899.
- Huber G, Martin JR, Löffler J, Moreau JL. Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach. *Brain Res.* 1993 Feb 19;603(2):348-52.
- Hüll M, Fiebich BL, Schumann G, Lieb K, Bauer J. Anti-inflammatory substances - a new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discov Today.* 1999 Jun;4(6):275-282.
- Igbavboa U, Sun GY, Weisman GA, He Y, Wood WG. Amyloid beta-protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary

- astrocytes. *Neuroscience*. 2009 Aug 18;162(2):328-38. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.04.049. Epub 2009 May 3.
- Iida T, Furuta A, Nishioka K, Nakabeppu Y, Iwaki T. Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol*. 2002 Jan;103(1):20-5.
 - Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism*. 2001 Jan;50(1):3-11.
 - Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994 Jul;13(1):45-53.
 - Jayasena T, Poljak A, Smythe G, Braidy N, Münch G, Sachdev P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013 Sep;12(4):867-83. doi: 10.1016/j.arr.2013.06.003. Review.
 - Jazvinščak Jembrek M, Slade N, Hof PR, Šimić G. The interactions of p53 with tau and Aβ as potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2018 May 4. pii: S0301-0082(17)30188-0. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.05.001.
 - Jeng JY, Yeh TS, Lee JW, Lin SH, Fong TH, Hsieh RH. Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. *J Cell Biochem*. 2008 Feb 1;103(2):347-57.

- Jian B, Yang S, Chen D, Chaudry I, Raju R. Influence of aging and hemorrhage injury on Sirt1 expression: Possible role of myc-Sirt1 regulation in mitochondrial function. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(11):1446-1451. doi:10.1016/j.bbadis.2011.04.010.
- Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, Ayuso-Peralta L, Jabbour-Wadiah T. [Oxidative stress and Alzheimer's disease]. *Rev Neurol*. 2006 Apr 1-15;42(7):419-27. Review. Spanish.
- Jiménez-Jiménez FJ, García-Ruiz PJ, de Bustos F. [Calcium, neuronal death and neurological disease]. *Rev Neurol*. 1996 Oct;24(134):1199-209. Review. Spanish.
- Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2012 Oct 9;4(10):1399-440. doi: 10.3390/nu4101399. Review.
- Jung GY, Lee JY, Rhim H, Oh TH, Yune TY. An increase in voltage-gated sodium channel current elicits microglial activation followed inflammatory responses in vitro and in vivo after spinal cord injury. *Glia*. 2013 Nov;61(11):1807-21. doi: 10.1002/glia.22559.
- Kahlig KM, Lepist I, Leung K, Rajamani S, George AL. Ranolazine selectively blocks persistent current evoked by epilepsy-associated NaV1.1 mutations. *British Journal of Pharmacology*. 2010;161(6):1414-1426. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00976.x.
- Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1271(1):110-117. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06738.x.

- Kang D, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*. 2007 Feb-Apr;7(1-2):39-44.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6.
- Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, Fujiki N, Nishino S, Holtzman DM. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science*. 2009 Nov 13;326(5955):1005-7. doi: 10.1126/science.1180962.
- Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winblad B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihailemm T, Kairane C, Zilmer M. The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res*. 2001 Apr;26(4):353-61.
- Karp CM, Tan TT, Mathew R, Nelson D, Mukherjee C, Degenhardt K, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer Res*. 2008 Jun 1;68(11):4105-15.
- Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 2016 Feb;173(4):692-702. doi: 10.1111/bph.13125.
- Kehl LJ, Fairbanks CA, Laughlin TM, Wilcox GL. Neurogenesis in postnatal rat spinal cord: a study in primary culture. *Science*. 1997 Apr 25;276(5312):586-9.
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Gamma-secretase is a membrane protein complex

- comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6382-7.
- King JR, Gillevet TC, Kabbani N. A G protein-coupled $\alpha 7$ nicotinic receptor regulates signaling and TNF- α release in microglia. *FEBS Open Bio*. 2017 Aug 7;7(9):1350-1361. doi: 10.1002/2211-5463.12270.
 - Knopman DS, Haeblerlein SB, Carrillo MC, Hendrix JA, Kerchner G, Margolin R, Knott C, Stern G, Wilkin G. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neuroscience*. 2000; 16: 724–739.
 - Knopman DS, Haeblerlein SB, Carrillo MC, Hendrix JA, Kerchner G, Margolin R, Maruff P, Miller DS, Tong G, Tome MB, Murray ME, Nelson PT, Sano M, Mattsson N, Sultzer DL, Montine TJ, Jack CR Jr, Kolb H, Petersen RC, Vemuri P, Canniere MZ, Schneider JA, Resnick SM, Romano G, van Harten AC, Wolk DA, Bain LJ, Siemers E. The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research. Framework for Alzheimer's disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr;14(4):563-575.
 - Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*. 2000 Dec;16(6):724-39.
 - Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science*. 2000 Sep 8;289(5485):1754-7.
 - Könner AC, Brüning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Jan;22(1):16-23. doi: 10.1016/j.tem.2010.08.007.

- Kooijman E, Nijboer CH, van Velthoven CTJ, et al. Long-Term Functional Consequences and Ongoing Cerebral Inflammation after Subarachnoid Hemorrhage in the Rat. Baud O, ed. PLoS ONE. 2014;9(3):e90584. doi:10.1371/journal.pone.0090584.
- Kumar R, Chatterjee P, Sharma PK, Singh AK, Gupta A, Gill K, Tripathi M, Dey AB, Dey S. Sirtuin1: a promising serum protein marker for early detection of Alzheimer's disease. PLoS One. 2013 Apr 16;8(4):e61560. doi: 10.1371/journal.pone.0061560.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 2007 Jul;8(7):499-509. Review.
- LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. Trends Mol Med. 2005 Apr;11(4):170-6. Review.
- Lahiri DK, Chen DM, Lahiri P, Bondy S, Greig NH. Amyloid, cholinesterase, melatonin, and metals and their roles in aging and neurodegenerative diseases. Ann N Y Acad Sci. 2005 Nov;1056:430-49. Review.
- Lamendola P, Nerla R, Pitocco D, Villano A, Scavone G, Stazi A, Russo G, Di Franco A, Sestito A, Ghirlanda G, Lanza GA, Crea F. Effect of ranolazine on arterial endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis. 2013 Jan;226(1):157-60.
- Lashuel HA, Hartley DM, Balakhaneh D, Aggarwal A, Teichberg S, Callaway DJ. New class of inhibitors of amyloid-beta fibril formation. Implications for the mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):42881-90.
- Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM. Cell death in Alzheimer's disease

- evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol.* 1995;89(1):35-41.
- Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):822-34. Review.
 - Lee M, Schwab C, McGeer PL. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia.* 2011 Jan;59(1):152-65. doi: 10.1002/glia.21087.
 - Lee MC, Ting KK, Adams S, Brew BJ, Chung R, Guillemin GJ. Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PLoS One.* 2010 Nov 30;5(11):e14123. doi: 10.1371/journal.pone.0014123.
 - Lei B, Cottrell JE, Kass IS. Neuroprotective effect of low-dose lidocaine in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Anesthesiology.* 2001 Aug;95(2):445-51.
 - Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Jun;33(6):1065-89. Review.
 - Lesourd M, Le Gall D, Baumard J, Croisile B, Jarry C, Osiurak F. Apraxia and Alzheimer's disease: review and perspectives. *Neuropsychol Rev.* 2013 Sep;23(3):234-56. doi: 10.1007/s11065-013-9235-4.
 - Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13541-6. Review.
 - Levi-montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic

- nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951 Mar;116(2):321-61.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 1995 Aug 18;269(5226):973-7.
 - Li P, Yang X, Wasser M, Cai Y, Chia W, Shen CP, Jan LY, Jan YN. Breaking symmetry in the CNS. *Trends Cell Biol.* 1997 Nov;7(11):422.
 - Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med.* 1999 Dec;5(12):1403-9.
 - Limoli PG, Vingolo EM, Limoli C, Scalinci SZ, Nebbioso M. Regenerative Therapy by Suprachoroidal Cell Autograft in Dry Age-related Macular degeneration: Preliminary In Vivo Report. *J Vis Exp.* 2018 Feb 12;(132). doi: 10.3791/56469.
 - Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):787-95. Review.
 - Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol.* 2002 Sep 1;156(5):445-53.
 - Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for

- therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jan;304(1):1-7. Review.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996 Jul 12;86(1):147-57.
 - Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Dec;36(12):2405-19. Review.
 - Lööv C, Hillered L, Ebendal T, Erlandsson A. Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury. *PLoS One.* 2012;7(3):e33090. doi: 10.1371/journal.pone.0033090.
 - Lorigados-Pedre L, Bergado-Rosado J. [Nerve growth factor in neurodegeneration and neurorestorative therapy]. *Rev Neurol.* 2004 May 16-31;38(10):957-71. Review.
 - Losy J. Is MS an inflammatory or primary degenerative disease? *Journal of Neural Transmission.* 2013;120(10):1459-1462. doi:10.1007/s00702-013-1079-9.
 - Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain.* 1999 Feb;122 (Pt 2):247-53.
 - Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995 Aug;45(8):1594-601.
 - Lovelock JD, Monasky MM, Jeong EM, Lardin HA, Liu H, Patel BG, Taglieri DM, Gu L, Kumar P, Pokhrel N, Zeng D, Belardinelli L, Sorescu D, Solaro RJ, Dudley SC Jr. Ranolazine improves

- cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circ Res.* 2012 Mar 16;110(6):841-50.
- Lujan B, Kushmerick C, Banerjee TD, Dagda RK, Renden R. Glycolysis selectively shapes the presynaptic action potential waveform. *J Neurophysiol.* 2016 Dec 1;116(6):2523-2540. doi: 10.1152/jn.00629.2016. Epub 2016 Sep 7.
 - Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, Graham SH, Chen J. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem.* 2006 Apr;97(2):435-48.
 - Luteran JD, Haroutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM. Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch Neurol.* 2000 Aug;57(8):1153-60.
 - Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1997 May;68(5):2061-9.
 - Ma J, Song Y, Shryock JC, Hu L, Wang W, Yan X, Zhang P, Belardinelli L. Ranolazine attenuates hypoxia- and hydrogen peroxide-induced increases in sodium channel late openings in ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014 Jul;64(1):60-8.
 - Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature.* 2000 Jun 22;405(6789):951-5.
 - Maloney B, Lahiri DK. The Alzheimer's amyloid β -peptide ($A\beta$) binds a specific DNA $A\beta$ -interacting domain ($A\beta$ ID) in the APP,

- BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif. *Gene*. 2011 Nov 15;488(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.gene.2011.06.004.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Jul;6(7):521-32. Review.
 - Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1998 Mar;150(1):40-4.
 - Markesbery WR, Lovell MA. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1998 Jan-Feb;19(1):33-6.
 - Matute C. Interaction between glutamate signalling and immune attack in damaging oligodendrocytes. *Neuron Glia Biol*. 2007 Nov;3(4):281-5. doi: 10.1017/S1740925X08000033.
 - McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. *Circulation*. 1996 Jan 1;93(1):135-42.
 - McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Jul;50(1):121-7.

- McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(3 Suppl):271-6. Review.
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology.* 1996 Aug;47(2):425-32.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1994 Nov;36(5):747-51.
- Mesulam MM, Rogalski EJ, Wieneke C, Hurley RS, Geula C, Bigio EH, Thompson CK, Weintraub S. Primary progressive aphasia and the evolving neurology of the language network. *Nat Rev Neurol.* 2014 Oct;10(10):554-69. doi: 10.1038/nrneurol.2014.159.
- Metsaars WP, Hauw JJ, van Welsem ME, Duyckaerts C. A grading system of Alzheimer disease lesions in neocortical areas. *Neurobiol Aging.* 2003 Jul-Aug;24(4):563-72.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12683-8.
- Montine TJ, Huang DY, Valentine WM, Amarnath V, Saunders A, Weisgraber KH, Graham DG, Strittmatter WJ. Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Feb;55(2):202-10.
- Morimoto T, Ohsawa I, Takamura C, Ishiguro M, Kohsaka S. Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse

- formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 1998 Jan 15;51(2):185-95.
- Morrow DA, Scirica BM, Chaitman BR, McGuire DK, Murphy SA, Karwatowska-Prokopczuk E, McCabe CH, Braunwald E; MERLIN-TIMI 36 Investigators. Evaluation of the glycometabolic effects of ranolazine in patients with and without diabetes mellitus in the MERLIN-TIMI 36 randomized controlled trial. *Circulation*. 2009 Apr 21;119(15):2032-9.
 - Mrak RE, Griffin WS. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 2005 Mar;26(3):349-54. Review.
 - Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992 Aug;1(5):345-7.
 - Munoz DG, Feldman H. Causes of Alzheimer's disease. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*. 2000;162(1):65-72.
 - Murray MM, Krone MG, Bernstein SL, Baumketner A, Condrón MM, Lazo ND, Teplow DB, Wytttenbach T, Shea JE, Bowers MT. Amyloid beta-protein: experiment and theory on the 21-30 fragment. *J Phys Chem B*. 2009 Apr 30;113(17):6041-6. doi: 10.1021/jp808384x.
 - Ndubaku U, de Bellard ME. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem*. 2008;110(3):182-95. Review.
 - Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Sep;3(9):748-55. Review.

- Neumann H, Wekerle H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 Jan;57(1):1-9. Review.
- Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*. 2003 Oct;26(10):536-42. Review.
- Nguyen PV, Gerlai R. Behavioural and physiological characterization of inbred mouse strains: prospects for elucidating the molecular mechanisms of mammalian learning and memory. *Genes Brain Behav*. 2002 May;1(2):72-81. Review.
- Nieminen TH, Hagelberg NM, Saari TI, Grönlund J, Neuvonen PJ, Olkkola KT. Re: Pergolizzi et al. 2011: Exposure to potential CYP450 pharmacokinetic drug-drug interactions. *Pain Pract*. 2012 Jan;12(1):81-2.
- Ning Y, Zhen W, Fu Z, Jiang J, Liu D, Belardinelli L, Dhalla AK. Ranolazine increases β -cell survival and improves glucose homeostasis in low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Apr;337(1):50-8. doi: 10.1124/jpet.110.176396.
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005 Oct 14;310(5746):314-7.
- Novo R, Azevedo PS, Minicucci MF, Zornoff LAM, Paiva SAR. Effect of Beta-Carotene on Oxidative Stress and Expression of Cardiac Connexin 43. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2013;101(3):233-239. doi:10.5935/abc.20130160.

- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Aug;60(8):759-67.
- Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2003 Apr 3;348(14):1356-64. Review. Erratum in: *N Engl J Med.* 2003 Jun 19;348(25):2588.
- Olazarán J, Muñiz R, Reisberg B, Peña-Casanova J, del Ser T, Cruz-Jentoft AJ, Serrano P, Navarro E, García de la Rocha ML, Frank A, Galiano M, Fernández-Bullido Y, Serra JA, González-Salvador MT, Sevilla C. Benefits of cognitive-motor intervention in MCI and mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology.* 2004 Dec 28;63(12):2348-53.
- Ortega-Camarillo C, Díaz-Flores M, Avalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Rosales-Torres AM. [Apoptosis and its biomedical significance]. *Gac Med Mex.* 2001 Nov-Dec;137(6):563-77. Review.
- Palmer AM, Burns MA. (1994). Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res* 645(1-2): 338-342.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci.* 1999 Oct 1;19(19):8487-97.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 1997;8(6):389-404.

- Pappalardo LW, Samad OA, Black JA, Waxman SG. Voltage-gated sodium channel Nav1.5 contributes to astrogliosis in an in vitro model of glial injury via reverse Na (+) /Ca (2+) exchange. *Glia*. 2014; 62:1162–1175.
- Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, Bozner P. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol*. 1998 Apr;152(4):871-7.
- Parekh N, Mitis F, Sethi D. Progress in preventing injuries: a content analysis of national policies in Europe. *Int J Inj Contr Saf Promot*. 2015;22(3):232-42.
- Park YY, Johnston D, Gray R. Slowly inactivating component of Na⁺ current in peri-somatic region of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2013; 109: 1378–1390.
- Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF Jr, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A. (2012). Glial cells in (patho) physiology. *J Neurochem* 121(1): 4-27.
- Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 2007 Aug 24;317(5841):1083-6.
- Peters CH, Sokolov S, Rajamani S, Ruben PC. Effects of the antianginal drug, ranolazine, on the brain sodium channel Na (V) 1.2 and its modulation by extracellular protons. *Br J Pharmacol*. 2013; 169: 704–716.

- Peterson GL. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* Dec; 83(2): 346-356.
- Phillips NR, Simpkins JW, Roby RK. Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer's brains: a review. *Alzheimers Dement.* 2014 May;10(3):393-400. doi:10.1016/j.jalz.2013.04.508.
- Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 99–104. PPAR-gamma decreases the inflammatory response of many cardiovascular cells, particularly endothelial cells.
- Praticò D, Rossi E, Merli M, Riggio O, FitzGerald GA, Violi F. Portal levels of the isoprostane F2 alpha-III, a marker of lipid peroxidation, do not correlate with increased portal pressure in cirrhotic patients. *J Investig Med.* 1998 Dec;46(9):430-4.
- Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci.* 2001 Jun 15;21(12):4183-7.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999 Mar;3(3):287-96.
- Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD, Pasinetti GM. PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol.* 2009 Mar;66(3):352-61. doi: 10.1001/archneurol.2008.588.
- Quintanilla RA, Orellana JA, von Bernhardi R. Understanding risk factors for Alzheimer's disease: interplay of neuroinflammation,

- connexin-based communication and oxidative stress. Arch Med Res. 2012 Nov;43(8):632-44. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.10.016.
- Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. J Neurosci. 2002 Feb 1;22(3):614-8. Review.
 - Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. Mediators Inflamm. Doi: 10.1155/2013/480739.
 - Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. Mediators Inflamm. 2013;2013:480739. doi: 10.1155/2013/480739.
 - Ramesh S, Govindarajulu M, Suppiramaniam V, Moore T, Dhanasekaran M. Autotaxin⁻Lysophosphatidic Acid Signaling in Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci. 2018 Jun 21;19(7). pii: E1827. doi: 10.3390/ijms19071827. Review.
 - Ramón y Cajal SR. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. Trab Lab Invest Biol Univ Madrid 11: 255-315.
 - Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. Nat Rev Immunol. 2012 Sep;12(9):623-35. doi: 10.1038/nri3265.
 - Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ. Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral Ischemia-induced neuronal damage in rat brain. J Neurosci. 2001 Mar 15;21(6):1876-83.

- Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2008 Feb;14(2):45-53. doi: 10.1016/j.molmed.2007.12.002.
- Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*. 1995 Apr;9(7):526-33. Review
- Rekas A, Jankova L, Thorn DC, Cappai R, Carver JA. Monitoring the prevention of amyloid fibril formation by alpha-crystallin. Temperature dependence and the nature of the aggregating species. *FEBS J*. 2007 Dec;274(24):6290-304.
- Rentoumi V, Raoufian L, Ahmed S, de Jager CA, Garrard P. Features and machine learning classification of connected speech samples from patients with autopsy proven Alzheimer's disease with and without additional vascular pathology. *J Alzheimers Dis*. 2014;42 Suppl 3: S3-17. doi: 10.3233/JAD-140555.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.
- Riccio A. RNA targeting and translation in axons. *Science*. 2018 Mar 23;359(6382):1331-1332. doi: 10.1126/science.aat1498.
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T. Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 2;91(16):7450-4.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of microglia in central nervous system

- p>infections. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct;17(4):942-64, table of contents. Review.
- Rodriguez AM, Nakhle J, Griessinger E, Vignais ML. Intercellular mitochondria trafficking highlighting the dual role of mesenchymal stem cells as both sensors and rescuers of tissue injury. Cell Cycle. 2018;17(6):712-721.
 - Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, Berry DL, McGeer PL, Kaszniak AW, Zalski J, Cofield M, Mansukhani L, Willson P, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. Neurology. 1993 Aug;43(8):1609-11.
 - Röncke R, Klemm A, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reymann KG. Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? PLoS One. 2008 Sep 18;3(9):e3236. doi: 10.1371/journal.pone.0003236.
 - Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. Brain Res Bull. 2009 Oct 28;80(4-5):224-32. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.07.012.
 - Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. Nature. 2000 Jan 20;403(6767):316-21.
 - Roth M. Euthanasia and related ethical issues in dementias of later life with special reference to Alzheimer's disease. Br Med Bull. 1996 Apr;52(2):263-79.
 - Roth M. Euthanasia and related ethical issues in dementias of later life with special reference to Alzheimer's disease. Br Med Bull. 1996 Apr;52(2):263-79.
 - Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncel RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for

- astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 1996 Mar;16(3):675-86.
- Sala G, Galimberti G, Canevari C, Raggi ME, Isella V, Facheris M, Appollonio I, Ferrarese C. Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity. *Neurobiol Aging*. 2003 Nov;24(7):909-14.
 - Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004 Feb 19;427(6976):740-4.
 - Sanghera N, Swann MJ, Ronan G, Pinheiro TJ. Insight into early events in the aggregation of the prion protein on lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1788(10):2245-51. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.08.005.
 - Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1997 May;68(5):2092-7.
 - Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):864-70.

- Schram G, Zhang L, Derakhchan K, Ehrlich JR, Belardinelli L, Nattel S. Ranolazine: Ion-channel-blocking actions and in vivo electrophysiological effects. *British Journal of Pharmacology*. 2004;142(8):1300-1308. doi:10.1038/sj.bjp.0705879.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):741-66. Review.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science*. 1997 Jan 31;275(5300):630-1. Review.
- Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991 Apr;6(4):487-98. Review.
- Sgourakis NG, Yan Y, McCallum SA, Wang C, Garcia AE. The Alzheimer's peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: a combined MD / NMR study. *J Mol Biol*. 2007 May 18;368(5):1448-57.
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*. 1998 Aug 1;333 (Pt 3):471-90. Review. Erratum in: *Biochem J* 1998 Nov 1;335(Pt 3):711.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Perkicak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):754-60.

- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*. 2000 Dec 1;20(23):8727-35.
- Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol*. 1997 Dec;148(2):577-86.
- Shoelson SE, White MF, Kahn CR. Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J Biol Chem*. 1988 Apr 5;263(10):4852-60.
- Shryock JC, Belardinelli L. Inhibition of late sodium current to reduce electrical and mechanical dysfunction of ischaemic myocardium. *British Journal of Pharmacology*. 2008;153(6):1128-1132. doi:10.1038/sj.bjp.0707522.
- Shuvaev VV, Laffont I, Serot JM, Fujii J, Taniguchi N, Siest G. Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001 May-Jun;22(3):397-402.
- Siddiqui MA, Keam SJ. Ranolazine: a review of its use in chronic stable angina pectoris. *Drugs*. 2006;66(5):693-710. Review.
- Skaper SD. The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Dec;1122:23-34. Review.
- Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*. 1993 Jun 25;260(5116):1953-5.
- Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases.

- Brain Res Bull. 2012 Jan 4;87(1):10-20. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.10.004.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
 - Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature.* 2007 Mar 1;446(7131):76-8.
 - Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 2002 May 2;417(6884):39-44.
 - Song YSJ, Belardinelli L. A slowly inactivating sodium current contributes to spontaneous diastolic depolarization of atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: 1254-1262.
 - Sörensen L, Ekstrand M, Silva JP, Lindqvist E, Xu B, Rustin P, Olson L, Larsson NG. Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J Neurosci.* 2001 Oct 15;21(20):8082-90.
 - Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One.* 2010 Mar 3;5(3):e9505. doi: 10.1371/journal.pone.0009505.
 - Sossalla S, Maier LS. Role of ranolazine in angina, heart failure, arrhythmias, and diabetes. *Pharmacol Ther.* 2012 Mar;133(3):311-23. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.11.003.
 - Squire LR. Lost forever or temporarily misplaced? The long debate about the nature of memory impairment. *Learn Mem.* 2006 Sep-Oct;13(5):522-9.

- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012 Dec;114(8):785-96. doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006.
- Strohmeyer R, Rogers J. Molecular and cellular mediators of Alzheimer's disease inflammation. *J Alzheimers Dis.* 2001 Feb;3(1):131-157.
- Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1994 Dec 20;5(18):2529-33.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature.* 1996 Oct 17;383(6601):624-7.
- Sun Z, Tong G, Ma N, Li J, Li X, Li S, Zhou J, Xiong L, Cao F, Yao L, Wang H, Shen L. NDRG2: a newly identified mediator of insulin cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2013 May;108(3):341.
- Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, Wanderi EW, Lust WD, Landreth GE. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience.* 2005;130(3):685-96.
- Sutherland GT, Chami B, Youssef P, Witting PK. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox Rep.* 2013;18(4):134-41. doi: 10.1179/1351000213Y.0000000052. Review.
- Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA, Giliberto L. Signaling Effect of Amyloid- β 42 on the Processing of A β PP. *Experimental*

- neurology. 2010;221(1):18-25.
doi:10.1016/j.expneurol.2009.09.002.
- Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Feb;9(1):135-41. Review.
 - Temple S. The development of neural stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):112-7. Review.
 - Tolkovsky AM, Xue L, Fletcher GC, Borutaite V. Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie.* 2002 Feb-Mar;84(2-3):233-40. Review.
 - Tomlinson BE, Blessed G, Roth M. Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci.* 1970 Sep;11(3):205-42.
 - Trushina E, McMurray CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience.* 2007 Apr 14;145(4):1233-48. Epub 2007 Feb 14. Review.
 - Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci.* 1996 Feb 1;16(3):877-85. Review.
 - Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Feb;37(2):289-305. Review.
 - Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature.* 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):756-61.
 - Undrovinas AI, Belardinelli L, Undrovinas NA, Sabbah HN. Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late

- sodium current. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006 May;17 Suppl 1:S169-S177.
- Vallés SL, Borrás C, Gambini J, Furriol J, Ortega A, Sastre J, Pallardó FV, Viña J. Oestradiol or genistein rescues neurons from amyloid beta-induced cell death by inhibiting activation of p38. *Aging Cell*. 2008 Jan;7(1):112-8.
 - Vallés SL, Dolz-Gaiton P, Gambini J, Borrás C, Lloret A, Pallardo FV, Viña J. Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res*. 2010 Feb 2;1312:138-44. doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.044.
 - Van Der Zee EA, De Jong GI, Strosberg AD, Luiten PG. Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. *Glia*. 1993 May;8(1):42-50.
 - Van Veen S, Chang PC. Prostaglandins and nitric oxide mediate insulin-induced vasodilation in the human forearm. *Cardiovasc Res*. 1997 Apr;34(1):223-9.
 - Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2004;23(1-2):105-14. Review.
 - Vassar R. The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2001 Oct;17(2):157-70. Review.
 - Villano A, Di Franco A, Nerla R, Sestito A, Tarzia P, Lamendola P, Di Monaco A, Sarullo FM, Lanza GA, Crea F. Effects of ivabradine and ranolazine in patients with microvascular angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2013 Jul 1;112(1):8-13.
 - Virchow. The Pathology of Miners' Lung. *Edinb Med J*. 1858 Sep;4(3):204-213.

- Volterra A, Steinhäuser C. Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia*. 2004 Aug 15;47(3):249-57. Review.
- Von Lewinski D, Bruns S, Walther S, Kögler H, Pieske B. Insulin causes $[Ca^{2+}]_i$ -dependent and $[Ca^{2+}]_i$ -independent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circulation*. 2005 May 24;111(20):2588-95.
- Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro MT, Kadkhodayan S, Fairbrother WJ, Dixit VM. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):12275-9.
- Wallace DC. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J*. 2000a Feb;139(2 Pt 3):S70-85. Review.
- Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:353-88. Review.
- Wallace MN, Geddes JG, Farquhar DA, Masson MR. Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp Neurol*. 1997 Apr;144(2):266-72.
- Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*. 2007 Jun;101(5):1172-84. Epub 2007 Feb 5. Review.
- Wan H, Yuan Y, Qian A, Sun Y, Qiao M. Pioglitazone, a PPARgamma ligand, suppresses NFkappaB activation through inhibition of IkappaB kinase activation in cerulein-treated AR42J cells. *Biomed. Pharmacother*. 2007; 62: 466–472.
- Wan H, Yuan Y, Qian A, Sun Y, Qiao M. Pioglitazone, a PPARgamma ligand, suppresses NFkappaB activation through

- inhibition of IkappaB kinase activation in cerulein-treated AR42J cells. *Biomed Pharmacother.* 2008 Sep;62(7):466-72.
- Wang H, Zhao Y, Zhang S, Liu G, Kang W, Tang H, et al. PPAR- γ agonist curcumin reduces the amyloid- β -stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20: 1189–1199.
 - Wei R, Jonakait GM. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J Neuroimmunol.* 1999 Mar 1;95(1-2):8-18.
 - Weisz T. Some Assembly Required: Foot Care for Persons with Diabetes in Ontario, Canada. *Can J Diabetes.* 2016 Dec;40(6):492-495.
 - Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* 2009 Mar;108(6):1343-59. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05886.x.
 - Williamson J, Goldman J, Marder KS. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist.* 2009 Mar;15(2):80-6. doi: 10.1097/NRL.0b013e318187e76b. Review.
 - Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 1998 Feb 26;391(6670):900-4.

- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 1997 Dec 1;139(5):1281-92.
- Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron.* 2002 Aug 1;35(3):419-32. Review.
- Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.* 2006 Sep;12(9):1005-15. Review.
- Xing D, Wang J, Ou S, Wang Y, Qiu B, Ding D, Guo F, Gao Q. Expression of neonatal Nav1.5 in human brain astrocytoma and its effect on proliferation, invasion and apoptosis of astrocytoma cells. *Oncol Rep.* 2014 Jun;31(6):2692-700. doi: 10.3892/or.2014.3143.
- Xing W, Yan W, Fu F, Jin Y, Ji L, Liu W, Wang L, Lv A, Duan Y, Zhang J, Zhang H, Gao F. Insulin inhibits myocardial ischemia-induced apoptosis and alleviates chronic adverse changes in post-ischemic cardiac structure and function. *Apoptosis.* 2009 Sep;14(9):1050-60. doi: 10.1007/s10495-009-0378-y.
- Xu C, Loh HH, Law PY. Effects of addictive drugs on adult neural stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Jan;73(2):327-48. Review.
- Xu S, Zhong M, Zhang L, Wang Y, Zhou Z, Hao Y, Zhang W, Yang X, Wei A, Pei L, Yu Z. Overexpression of Tfam protects mitochondria against beta-amyloid-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *FEBS J.* 2009 Jul;276(14):3800-9.
- Xu S, Zhong M, Zhang L, Wang Y, Zhou Z, Hao Y, Zhang W, Yang X, Wei A, Pei L, Yu Z. Overexpression of Tfam protects

- mitochondria against beta-amyloid-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *FEBS J.* 2009 Jul;276(14):3800-9. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07094.x.
- Yamamoto M, Kamatsuka Y, Ohishi A, Nishida K, Nagasawa K. P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Sep 13;439(1):90-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.022.
 - Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1772(8):958-67.
 - Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.* 2013 Sep;62:90-101. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014.
 - Yang M, Teplow DB. Amyloid beta-protein monomer folding: free-energy surfaces reveal alloform-specific differences. *J Mol Biol.* 2008a Dec 12;384(2):450-64. doi:10.1016/j.jmb.2008.09.039.
 - Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci.* 2008b Feb 27;28(9):2231-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3574-07.2008.
 - Yao ZX, Papadopoulos V. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J.* 2002 Oct;16(12):1677-9.
 - Ye J. Regulation of PPARgamma function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Sep 26;374(3):405-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.068.

- Yoo HY, Chang MS, Rho HM. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene*. 1999 Jun 24;234(1):87-91.
- Yu L, Edalji R, Harlan JE, Holzman TF, Lopez AP, Labkovsky B, Hillen H, Barghorn S, Ebert U, Richardson PL, Miesbauer L, Solomon L, Bartley D, Walter K, Johnson RW, Hajduk PJ, Olejniczak ET. Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer. *Biochemistry*. 2009 Mar 10;48(9):1870-7. doi: 10.1021/bi802046n.
- Yu WF, Nordberg A, Ravid R, Guan ZZ. Correlation of oxidative stress and the loss of the nicotinic receptor alpha 4 subunit in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2003 Feb 20;338(1):13-6.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001 Aug 31;293(5535):1673-7.
- Zacharowski K, Blackburn B, Thiemermann C. Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, reduces myocardial infarct size and cardiac troponin T release in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2001 Apr 20;418(1-2):105-10.
- Zarranz JJ. [Precision in historical quotations]. *Neurologia*. 2013 Oct;28(8):524. doi: 10.1016/j.nrl.2012.07.006.
- Zaza A, Belardinelli L, Shryock JC. Pathophysiology and pharmacology of the cardiac "late sodium current.". *Pharmacol Ther*. 2008 Sep;119(3):326-39. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.06.001.

- Zhang R, Huang Q, Zou L, Cao X, Huang H, Chu X. Beneficial effects of deferoxamine against astrocyte death induced by modified oxygen glucose deprivation. *Brain Res.* 2014 Oct 2;1583:23-33. doi: 10.1016/j.brainres.2014.08.016.
- Zhang S, Iwata K, Lachenmann MJ, Peng JW, Li S, Stimson ER, Lu Y, Felix AM, Maggio JE, Lee JP. The Alzheimer's peptide a beta adopts a collapsed coil structure in water. *J Struct Biol.* 2000 Jun;130(2-3):130-41.
- Zhang ZY, Daniels R, Schluesener HJ. Oridonin ameliorates neuropathological changes and behavioural deficits in a mouse model of cerebral amyloidosis. *J Cell Mol Med.* 2013 Dec;17(12):1566-76. doi: 10.1111/jcmm.12124.
- Zhao X, Strong R, Zhang J, Sun G, Tsien JZ, Cui Z, Grotta JC, Aronowski J. Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2009 May 13;29(19):6186-95
- Zhou X, Han D, Xu R, Li S, Wu H, Qu C, Wang F, Wang X, Zhao Y. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PLoS One.* 2014 Dec 11;9(12):e115148. doi: 10.1371/journal.pone.0115148.
- Zhou Y, Li HL, Zhao R, Yang LT, Dong Y, Yue X, Ma YY, Wang Z, Chen J, Cui CL, Yu AC. Astrocytes express N-methyl-D-aspartate receptor subunits in development, ischemia and post-ischemia. *Neurochem Res.* 2010 Dec;35(12):2124-34.
- Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1772(4):494-502.

- Zhu X, Smith MA, Perry G, Aliev G. Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2004 Nov-Dec;19(6):345-52. Review.
- Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Sep;64(17):2202-10. Review.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci.* 2003 Jan;6(1):43-50.
- Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci.* 2002 Jun 15;22(12):4833-41.



CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE,
CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL

DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA,
GANADERÍA Y PESCA



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00220

Vista la solicitud realizada en fecha 21/11/16 con nº reg. entrada 29748 por D/Dª. Pilar Campins Falcó, Vicerrectora de Investigación i Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

"Mecanismos de acción de diferentes fármacos en células neurales en cultivo primario (sugamadex, rocuronio, ranolazina) y otras sustancias (cannabis, alcohol, colas, etc.)"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2016/VSC/PEA/00220 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Uinversitat de Valencia

Responsable del proyecto: Lilian Soraya Vallés Martí

Establecimiento: Animalario Facultad de Medicina y Odontología de Valencia

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 14 de diciembre de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca


Rogelio Llanes Ribas